

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR  
FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE  
(SCHWERPUNKT FRAUENHEILKUNDE)  
DIREKTOR: PROF. DR. MED. OLAF ORTMANN  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Target-spezifische anti-ErbB2 - und anti-ER $\alpha$  - Behandlungen in Abhängigkeit der  
Koexpression von ErbB4- und Estrogen-Rezeptoren beim Mammakarzinom**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Dominik Chittka

2014



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR  
FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE  
(SCHWERPUNKT FRAUENHEILKUNDE)  
DIREKTOR: PROF. DR. MED. OLAF ORTMANN  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Target-spezifische anti-ErbB2 - und anti-ER $\alpha$  - Behandlungen in Abhängigkeit der  
Koexpression von ErbB4- und Estrogen-Rezeptoren beim Mammakarzinom**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Dominik Chittka

2014

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Gero Brockhoff

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Dipl.-Phys. Peter Heiss

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2014

**Meinen Eltern Monika und Fritz Chittka, meinen Brüdern Tobias und Manuel sowie meiner  
Freundin Christiane in Dankbarkeit gewidmet**

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1.	Das Mammakarzinom	1
1.1.1.	Epidemiologie	1
1.1.2.	Ätiologie	2
1.1.3.	Klassifikation	2
1.1.4.	Molekularbiologische Karzinogenese	3
1.2.	Die Rezeptor-Tyrosinkinasen der ErbB-Familie	4
1.2.1.	Die Rezeptor-Tyrosinkinasen	4
1.2.2.	Die ErbB-Rezeptoren	5
1.2.3.	Die Signaltransduktion der ErbB-Rezeptoren	8
1.2.4.	ErbB-Rezeptoren und ihre Rolle in der Tumorentstehung	10
1.2.5.	Neue Ansätze in der Therapie des ErbB2-exprimierenden Mammakarzinoms	10
1.2.5.1.	Die monoklonalen Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab	10
1.2.5.2.	Der niedermolekulare Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib	13
1.2.6.	Die besondere Rolle des ErbB4-Rezeptors	14
1.2.6.1.	Die extrazelluläre Domäne	15
1.2.6.2.	Die intrazelluläre Domäne (4ICD)	15
1.2.6.3.	Expression von ErbB4-Isoformen in Normal- und Tumorgewebe	15
1.2.6.4.	ErbB4 und Brustkrebs	16
1.3.	Der Estrogen-Rezeptor	16
1.3.1.	Estrogene in gesundem Gewebe	16
1.3.2.	Estrogene und Brustkrebs	16
1.3.3.	Die Estrogen-Rezeptoren	17
1.3.3.1.	Die Funktionsweise der Estrogenrezeptoren und das Zusammenspiel zwischen Estrogenrezeptor- und RTK-Signalwegen	17
1.3.3.2.	Möglichkeiten der endokrinen Therapie	19
1.3.3.2.1.	Der Selektive Estrogenrezeptormodulator (SERM) Tamoxifen	20
1.4.	Zielsetzung	21
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
2.1.	Die Zellkultur	23
2.1.1.	Verwendete Zelllinien	23
2.1.2.	Die Standardkultur	24
2.1.2.1.	Zellernte und Zellzahl-Bestimmung	24
2.1.2.2.	Herstellung von denaturierten Zellextrakten (Zelllyse)	24
2.1.2.3.	Downregulation eines Rezeptors mittels siRNA	25
2.1.2.4.	Die Zellkultur-Protokolle	28
2.1.2.5.	Behandlung mit Wachstumsfaktoren und ErbB2-Targeting	29
2.1.2.5.1.	Behandlungsschema Wildtyp	30
2.1.2.5.2.	Behandlungsschema ErbB4-Downregulation	30
2.1.2.5.3.	Behandlungsschema ER-Downregulation	31
2.2.	Proteinbiochemische Methoden	31
2.2.1.	Die Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA-Protein-Assay-Kit	31
2.2.2.	Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.2.3.	Der Western-Blot	32
2.2.4.	Die Chemolumineszenz zum Nachweis der Proteine	33
2.2.5.	Auswertung der Western-Blot-Filme mit ImageQuant	33

<b>2.3.</b>	<b>Durchflusszytometrische Analyse</b>	<b>34</b>
2.3.1.	<i>Der Zellzyklus</i>	34
2.3.2.	<i>Färbung der Zellen für Quenching-Messungen</i>	35
2.3.3.	<i>Gewinnung und Färbung der Zellen für Annexin-Messungen</i>	35
2.3.4.	<i>Durchflusszytometrische Fluoreszenzanalytik</i>	36
2.3.5.	<i>Das Durchflusszytometer FACSCanto II</i>	36
2.3.6.	<i>Standardsoftware</i>	37
2.3.7.	<i>Datendarstellung und Datenverarbeitung</i>	37
2.3.8.	<i>Die BrdU/Hoechst-Quenching Technik</i>	38
2.3.9.	<i>Der Annexin-V/ FITC –Apoptose-Assay</i>	41
<b>2.4.</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>42</b>
<b>2.5.</b>	<b>Materialien</b>	<b>43</b>
2.5.1.	<i>Medien und Zusätze für die Zellkultur</i>	43
2.5.2.	<i>Antikörper</i>	43
2.5.2.1.	<i>Primärantikörper</i>	43
2.5.2.2.	<i>Sekundärantikörper</i>	43
2.5.3.	<i>DNA-Farbstoffe, Basenanaloga, Enzyme und Wachstumsfaktoren</i>	43
2.5.3.1.	<i>DNA-Farbstoffe, Basenanaloga</i>	43
2.5.3.2.	<i>Enzyme</i>	44
2.5.3.3.	<i>Wachstumsfaktoren</i>	44
2.5.3.4.	<i>Molekulargewichtsstandard</i>	44
2.5.4.	<i>Gebrauchsfertig zusammengesetzte Reagentien (Kits)</i>	44
2.5.5.	<i>Reagentien und Chemikalien</i>	44
2.5.6.	<i>Puffer und Lösungen</i>	45
2.5.7.	<i>Verbrauchsmaterial</i>	46
2.5.8.	<i>Geräte</i>	47
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
3.1.	<b>SDS-PAGE und Western Blot-Untersuchungen zum Nachweis der erfolgreichen Downregulation</b>	<b>48</b>
3.2.	<b>SDS-PAGE und Western-Blot-Untersuchungen zum Ausschluss von „off target“ Effekten durch die siRNA-Zugabe</b>	<b>49</b>
3.3.	<b>Zellzyklusanalysen: BrdU/Hoechst-Quenching-Messungen</b>	<b>52</b>
3.3.1.	<i>BrdU/DC-Konzentrations-Versuche</i>	53
3.3.2.	<i>Inhibition der Zellproliferation bei untransfizierten „Wildtyp-ZR-75-1“</i>	55
3.3.3.	<i>Inhibition der Zellproliferation von ZR-75-1 in Abhängigkeit des ErbB4-Knockdowns</i>	55
3.3.4.	<i>Inhibition der Zellproliferation von ZR-75-1 in Abhängigkeit des ER<math>\alpha</math>-Knockdowns</i>	55
3.3.5.	<i>Zusammenfassende Betrachtung der Zellproliferationsmessungen</i>	56
3.4.	<b>Annexin-V-FITC-Apoptose-Assays</b>	<b>58</b>
3.4.1.	<i>Induktion von Apoptose bei untransfizierten „Wildtyp-ZR-75-1“</i>	58
3.4.2.	<i>Induktion von Apoptose in Abhängigkeit des ErbB4-Knockdowns</i>	58
3.5.	<b>Zellzahlbestimmungen</b>	<b>60</b>
3.6.	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	<b>61</b>
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>63</b>
4.1.	<b>Die Effekte von ErbB2- und ER-Targeting auf „Wildtyp-ZR-75-1“</b>	<b>64</b>
4.1.1.	<i>Die Effekte der RTK-Antagonisten Trastuzumab, Pertuzumab und Lapatinib auf Proliferation, Apoptose und Zellzahl von „Wildtyp-ZR-75-1“</i>	64

4.1.2.	<i>Die Effekte des ER-Antagonisten Tamoxifen auf Proliferation, Apoptose und Zellzahl von „Wildtyp-ZR-75-1“</i>	65
4.2.	<b>Einfluss einer ErbB4-Downregulation auf die antiproliferativen Effekte von ErbB2- und ER-Targeting in ZR-75-1</b>	65
4.2.1.	<i>Einfluss einer ErbB4-Downregulation auf ZR-75-1-Brustkrebszellen</i>	66
4.2.2.	<i>Einfluss einer ErbB4-Downregulation auf die antiproliferativen Effekte der RTK-Antagonisten Trastuzumab, Pertuzumab und Lapatinib in ZR-75-1</i>	68
4.2.3.	<i>Einfluss einer ErbB4-Downregulation auf die antiproliferativen Effekte des ER-Antagonisten Tamoxifen in ZR-75-1</i>	70
4.2.4.	<i>Zusammenfassende Betrachtung des Einflusses einer ErbB4-Downregulation auf die antiproliferativen Effekte von ErbB2- und ER-Targeting in ZR-75-1</i>	74
4.3.	<b>Einfluss einer ER<math>\alpha</math>-Downregulation auf die antiproliferativen Effekte von ErbB2-Targeting in ZR-75-1</b>	74
4.3.1.	<i>Einfluss einer ER<math>\alpha</math>-Downregulation auf ZR-75-1-Brustkrebszellen</i>	74
4.3.2.	<i>Einfluss einer ER<math>\alpha</math>-Downregulation auf die antiproliferativen Effekte der RTK-Antagonisten Trastuzumab, Pertuzumab und Lapatinib in ZR-75-1</i>	75
5.	<b>Zusammenfassung.....</b>	76
6.	<b>Ausblick.....</b>	77
7.	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	80
8.	<b>Erklärung zur eigenhändigen Anfertigung.....</b>	89
9.	<b>Lebenslauf.....</b>	90
10.	<b>Danksagung.....</b>	92



## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ADCC	Antikörpervermittelte Zytotoxizität ( <i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i> )
BrdU	5-Bromo-2'-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bzw.	beziehungsweise
CDK	Cyclin-abhängige Kinase ( <i>cyclin-dependent kinase</i> )
Cu	Kupfer
d.h.	das heißt
DC	Desoxycytidin
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DFS	Krankheitsfreies Überleben ( <i>disease free survival</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> )
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor ( <i>epidermal growth factor receptor</i> )
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER = ERα	Estrogenrezeptor alpha
ERβ	Estrogenrezeptor beta
ERE	<i>estrogen response elements</i>
FACS	Fluorescence-Activated Cell Scanning
FCS2.0/ 3.0	<i>flow cytometry standard 2.0/ 3.0</i>
FKS	Fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer ( <i>fluorescence resonance energy transfer</i> )
FSC	Vorwärtsstreulicht ( <i>forward scatter light</i> )
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Her	<i>human EGFR-related receptor</i>
Hoe	Hoechst33258
HRG	Heregulin
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
ICD	Intrazelluläre Rezeptordomäne

IGF-1R	<i>insulin-like growth factor 1 receptor</i>
IgG	Immunglobulin G
JAK	Januskinase
JNK	<i>c-Jun amino-terminal kinase</i>
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knockdown</i>
l	Liter
LCIS	Lobuläres Carcinoma in situ
LP	Langpassfilter ( <i>long pass filter</i> )
M	molar
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase ( <i>mitogen activated protein kinase</i> )
min	Minute
Mio	Million
ml	Milliliter
mM	millimolar
nm	Nanometer
Nr	Nummer
NRG	Neuregulin
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PC	<i>personal computer</i>
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3'-Kinase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PMT	Photomultiplier ( <i>photo multiplier</i> )
PgR	Progesteronrezeptor
PTB	Phosphotyrosin-Bindungsdomäne
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RIP	Regulierte intramembranöse Proteolyse
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RPMI	<i>Roosevelt Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecylsulfate</i> )
SERD	Selektiver Estrogenrezeptor-Downregulator
SERM	Selektiver Estrogenrezeptormodulator
SH2	<i>Src-homology 2</i>
sog.	so genannt

SP	Kurzpassfilter ( <i>short pass filter</i> )
Src	Rous Sarcoma Virus Tyrosine Kinase
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht ( <i>sideward scatter light</i> )
T25, T175	25-, 175-cm <sup>2</sup> -Gewebekulturflaschen
Tab.	Tabelle
TACE	<i>TNF<math>\alpha</math>-converting enzyme</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	<i>time to progression</i>
Tween	Polyoxyethylensorbitmonolaurat
unb.	unbehandelt
V	Volt
verd.	Verdünnt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vgl.	vergleiche
YAP	<i>yes-associated protein</i>
z.B.	zum Beispiel

## 1. EINLEITUNG

Dank intensiver Forschungsarbeit auf dem Gebiet der modernen Onkologie konnten innerhalb weniger Jahre große Fortschritte in der Diagnostik und Therapie vieler hämatologischer und onkologischer Erkrankungen erzielt werden. So kann das Behandlungskonzept bei Tumorerkrankungen in der heutigen Zeit immer mehr auf das individuelle Leiden des Patienten und die Charakteristika seines Tumors zugeschnitten werden. Es wurden spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche von Tumorzellen entdeckt, die den Weg ebneten für die Entwicklung von target-spezifischen Therapien, die inzwischen bei vielen Tumorerkrankungen alleine oder als Zusatz zu den klassischen Chemotherapeutika zur Standardtherapie gehören. Der große Vorteil dieser Therapeutika besteht darin, dass sie im Gegensatz zu den klassischen Zytostatika, die ihre Wirkung auf alle sich teilenden Zellen entfalten, nun gezielt die Tumorzellen angreifen und daher im Allgemeinen auch verträglicher sind und weniger Nebenwirkungen mit sich bringen.

Ein wichtiges Beispiel für diese neue Medikamentengruppe ist der monoklonale Antikörper Trastuzumab gegen den auf der Oberfläche von Mammakarzinomzellen identifizierten Wachstumsfaktorrezeptor ErbB2, der vor 15 Jahren erstmals auf dem Markt zugelassen wurde und inzwischen nicht mehr aus der Therapie des ErbB2-überexprimierenden Mammakarzinoms wegzudenken ist. Die Entwicklung dieses Antikörpers war ein Meilenstein, der viele weitere Entdeckungen auf sich folgen ließ. Inzwischen findet man allein für den ErbB2-Rezeptor verschiedenste Wirkstoffe, die entweder gegen die extrazelluläre Domäne oder auch gegen die intrazelluläre Tyrosinkinase bzw. intrazelluläre Signalmoleküle gerichtet sind. Und mit jedem neu entdeckten Signalweg kommen neue Möglichkeiten der Therapie hinzu, die ein immer spezifischeres Eingreifen in das Tumorstadium zulassen. Doch trotz all dieser Erfolge hat sich über die letzten Jahre gezeigt, dass noch andere Faktoren neben der alleinigen Überexpression des Rezeptors darüber entscheiden, ob Patienten auf die neuen Therapeutika ansprechen oder nicht. Ein großer Teil der Patienten scheint trotz Anwesenheit des Rezeptors nicht auf Trastuzumab zu reagieren oder die Sensitivität im Laufe der Therapie zu verlieren. Daher ist es Gegenstand der aktuellen Forschung, die Gründe für solche Resistenzentwicklungen mehr und mehr aufzudecken, um frühzeitig eine Aussage bezüglich der Erfolgsaussichten treffen zu können. Ein Punkt, der immer wieder in diesem Zusammenhang genannt wird, ist die gleichzeitige Anwesenheit verwandter Rezeptoren wie des ErbB4-Rezeptors, oder auch von Vertretern anderer Rezeptorgruppen wie des Estrogenrezeptors (ER). Und genau diese Koexpression und ihr Einfluss auf eine gegen ErbB2 oder gegen den ER gerichtete Therapie wurde in den Versuchen der vorliegenden Arbeit untersucht.

### 1.1 Das Mammakarzinom

#### 1.1.1 Epidemiologie

Das Mamma-Karzinom, eine maligne Entartung der Brustdrüse, macht 26 % aller Krebserkrankungen der Frau aus und stellt somit die häufigste Tumorerkrankung des weiblichen Geschlechts dar. Jede 8. bis 10. Frau in den westlichen Industrieländern erkrankt nach derzeitigem Stand im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Das ergibt in Deutschland eine Inzidenz von ca. 47.000 Neuerkrankungen pro Jahr.

Frauen jeden Alters können betroffen sein, jedoch nimmt die Häufigkeit mit steigendem Lebensalter zu und der Altersgipfel findet sich zwischen 60 und 80 Jahren. Beim Mammakarzinom

handelt es sich mit 17 % um die häufigste tumorbedingte Todesursache bei Frauen und bei Frauen zwischen 40 und 55 Jahren sogar um die häufigste Todesursache überhaupt (10). Die 10-Jahres-Überlebensrate, die natürlich von vielen verschiedenen Faktoren abhängt, liegt derzeit über alle Stadien bei etwa 60 bis 70 % (14).

### 1.1.2 Ätiologie

Die genaue Ursache für die Entstehung des Mammakarzinoms ist bis heute noch nicht bekannt. Mehr als 90 % entstehen jedoch sporadisch, während die hereditären Krebserkrankungen mit einer Mutation im BRCA 1-, BRCA 2 – und im p53-Gen nur etwa 5 % ausmachen. Viele Studien jedoch haben gezeigt, dass neben der genetischen Komponente sowohl Umweltfaktoren, hormonelle als auch morphologische Veränderungen das Risiko deutlich erhöhen. So prädisponieren für das Auftreten eines Mammakarzinoms eine positive Familienanamnese, eine frühe Menarche bzw. späte Menopause, eine erhöhte Hormon-Exposition, eine Nulliparität, eine Adipositas, fortgeschrittenes Alter, ein Karzinom der lateralen Seite sowie strukturelle Veränderungen wie duktale Hyperplasie oder ein lobuläres bzw. duktales Carcinoma in situ (CIS) (14).

### 1.1.3 Klassifikation

Das Mammakarzinom ist eine sehr heterogene Erkrankung, die entweder vom Epithel der Milchgänge (duktal) oder von den Drüsenläppchen (lobulär) ihren Ursprung nimmt. Das invasiv-duktales Karzinom (70-80 %) und das invasiv-lobuläre Karzinom (ca. 10 %) machen den größten Anteil aus. Diese infiltrativ wachsenden malignen epithelialen Tumoren entwickeln sich aus Vorläuferläsionen, den sog. Carcinoma in situ (CIS), die sich entsprechend der späteren Tumore in ein duktales Carcinoma in situ (DCIS, 95 %) und ein lobuläres Carcinoma in situ (LCIS, 5 %) unterteilen lassen. Diese karzinomatös entarteten Epithelproliferationen entstehen zum größten Teil am Übergang der Drüsenazini in die Milchgänge, an den sogenannten TDLEs (terminale duktulo-lobuläre Einheiten) und sind in den meisten Fällen nur histologisch nachzuweisen. Sie zeichnen sich im Gegensatz zu den infiltrativ wachsenden Tumoren durch eine erhaltene Basalmembran aus, die die Grenze zum umliegenden gefäßführenden Fett- und Bindegewebe darstellt.

Zu selteneren Subtypen des invasiven-duktales Karzinoms zählt man das medulläre (5 %), das tubuläre (2 %), das muzinöse (2 %) und das papilläre (1 %) Mammakarzinom (14).

Neben dieser histologischen bzw. pathologischen Klassifikation wird das Mammakarzinom wie jede andere Tumorerkrankung auch nach der pTNM-Klassifikation eingeteilt. Diese Stadiumeinteilung, die die Tumorgroße (T), den Lymphknotenbefall (N) und die Fernmetastasierung (M) berücksichtigt und als Staging bezeichnet wird, stellt den entscheidenden Faktor für die Therapie und Prognose des Mammakarzinoms dar.

Darüber hinaus spielt die Beurteilung der Aggressivität des Tumors (Malignitätsgrad), das sogenannte Grading, eine wichtige Rolle. Hierbei berücksichtigt man die Ausbildung von Tubuli, die den Grad der Kernatypien und die Mitosefrequenz und erhält danach folgende Einteilung:

G1: hoch differenziert  
G2: mäßig differenziert  
G3: schlecht / nicht differenziert

Ein zusätzlicher wichtiger prognostischer Faktor ist der Rezeptorstatus, der heutzutage immunhistochemisch semiquantitativ bestimmt wird. Man untersucht mit Antikörpern die Anwesenheit von Estrogen- und Progesteron-Rezeptoren auf der Oberfläche der Tumorzellen, da diese aufgrund einer möglichen Hormontherapie einen entscheidenden Einfluss auf die resultierende Prognose haben. So liegt nach endokriner Therapie die Regression bei Estrogenrezeptor-positiven Karzinomen um 70 %, wohingegen sie bei Estrogenrezeptor-negativen Tumoren nur 5 % beträgt.

Nach derzeitiger Studienlage weisen Estrogen- und Progesteronrezeptor-positive Mammakarzinome nach entsprechender Hormontherapie die beste Prognose auf (14).

In den letzten zehn Jahren nahm auch die Analyse molekularbiologischer Faktoren, wie des ErbB2-Onkogens oder des p53-Tumorsuppressorgens, für die Beurteilung der Prognose in ihrer Bedeutung entscheidend zu.

Anhand des Rezeptorstatus lassen sich heutzutage vier verschiedene Subklassen des Mammakarzinoms unterscheiden: ER+ (ER+/ERBB2-), ERBB2+ (ER-/ERBB2+), triple negative (ER-/PgR-/ERBB2-), und triple positiv (ER+/PR+/ERBB2+) (12).

#### 1.1.4 Molekularbiologische Karzinogenese

Der genaue Entstehungsweg vom gesunden Brustdrüsenepithel über transformierte, neoplastische Zellen und CIS zum invasiven Karzinom ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Man geht jedoch davon aus, dass, wie auch bei anderen malignen Entartungen, spezielle genetische Aberrationen ursächlich sind.

Zu dieser Annahme gelangte man aufgrund molekularbiologischer Untersuchungen von Mammakarzinomzellen, die eindeutig die Amplifikation bestimmter Onkogene bzw. die Deletion von Tumorsuppressorgen nachweisen konnten. Es konnte gezeigt werden, dass sich Mammakarzinome über genetisch definierte pathways entwickeln, die bestimmten histologischen Malignitätsgraden der In-situ- und invasiven Karzinomen zugeordnet werden können.

Im Folgenden werden beispielhaft Genloci aufgeführt, die häufig von Mutationen betroffen sind (10).

##### 1. Onkogene durch Amplifikation

- ➔ myc-Gen auf Chromosom 8q24
- ➔ EGFR-Gen auf Chromosom 7p13
- ➔ ErbB2-Gen auf Chromosom 17q12

##### 2. Inaktivierte Tumorsuppressorgene

- ➔ CDH-1-Gen auf Chromosom 16q22
- ➔ p53-Gen auf Chromosom 17p13

Als Grundlage für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche ist dabei besonders das ErbB2-Gen auf Chromosom 17q12 hervorzuheben, das für den human epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor ErbB2 (Her2) kodiert.

Ca. 20 % der Mammakarzinome weisen eine Amplifikation dieses Gens und somit eine Überexpression des ErbB2-Rezeptors auf. Dieser Rezeptor aus der Gruppe der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen stimuliert über verschiedene Signaltransduktionswege die Zellproliferation und stellt somit seit vielen Jahren ein aussichtsreiches neues Target für die Antikörperbehandlung von Mammakarzinomen dar.

## 1.2 Die Rezeptor-Tyrosinkinasen der ErbB-Familie

### 1.2.1 Die Rezeptor-Tyrosinkinasen

Im Gegensatz zu G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen zeichnen sich die Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) durch eine einzige Transmembran- $\alpha$ -Helix aus, die das C-terminale Ende im Zellinneren mit dem extrazellulären, ligandenbindenden Anteil des Rezeptors verbindet. Bislang wurden etwa 20 Subfamilien der RTK identifiziert, von denen in Abbildung 1 eine Auswahl aufgeführt ist. Bis auf den Insulin-Rezeptor, der als Tetramer vorliegt, handelt es sich bei allen bekannten RTK um Monomere. Über extrazelluläre Ligandenbindung wird bei den RTK eine Phosphorylierung des intrazellulären Kettenendes ausgelöst, die eine komplexe Signalkaskade innerhalb der Zelle in Gang setzt. Diese Phosphorylierung hat in zweifacher Hinsicht Anteil am Aktivierungsprozess. Erstens wird durch die Phosphorylierung von Tyrosinseitenketten innerhalb der Kinasedomäne die Aktivität des Enzyms selbst erhöht, zweitens ermöglicht die Phosphorylierung von Seitenketten außerhalb der Kinasedomäne das Andocken verschiedener intrazellulärer Signalproteine. Diese Signalproteine binden über eine definierte Phosphotyrosin bindende Domänen (PTB-Domänen) oder SH2-Domänen (Src homology 2) an das jeweilige Phosphotyrosin und werden so aktiviert, wodurch letztendlich die Signalweiterleitung vorangetrieben wird (3).

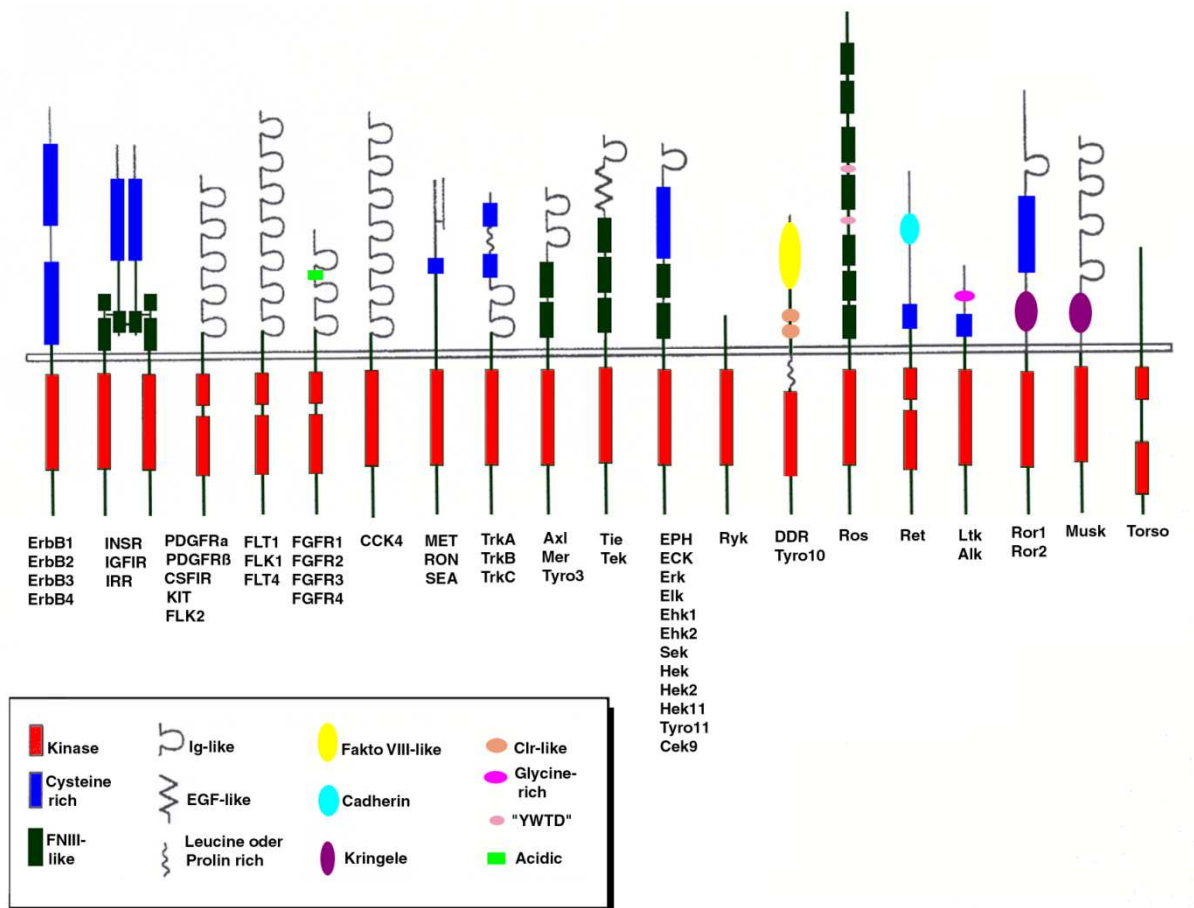


Abb. 1: Subfamilien der Rezeptortyrosinkinasen (RTK): Dargestellt sind die verschiedenen Rezeptor-Tyrosinkinasen und ihre funktionellen Domänen. Die aus ErbB1 – ErbB4 bestehende Klasse I der Rezeptor-Tyrosinkinasen ist ganz links abgebildet. Die cysteinereiche ligandenbindende Domäne ist blau und die Kinase-Domäne ist rot dargestellt. (133, Abb. 1)

### 1.2.2 Die ErbB-Rezeptoren

Zu den genannten RTK zählt unter anderem die Subklasse der ErbB-Rezeptoren. Diese umfasst den ErbB1, auch EGFR oder Her 1 genannt, den ErbB2 (Her2), ErbB3 (Her3) und den ErbB4 (Her4). Alle Rezeptoren dieser Klasse, mit Ausnahme des ErbB2, sind in der Lage, verschiedene extrazelluläre Liganden mit unterschiedlicher Affinität und Spezifität zu binden (79). Abb. 2 zeigt schematisch den Aufbau der 4 ErbB-Rezeptoren und ihre wichtigsten Liganden.

An den EGFR binden der *epidermal growth factor* (EGF), Amphiregulin (AR) und der *transformation growth factor-α* (TGF-α). Sowohl an EGFR als auch an ErbB4 binden Betacellulin (BTC), *heparin-binding* EGF (HB-EGF) und Epiregulin (EPR). Die Neureguline NRG-1 bis NRG-4, für die man auch die Bezeichnung Hereguline (HRG) findet, sind spezifische Liganden für ErbB3 (NRG-1, NRG-2) und ErbB4 (NRG-1 – NRG-4) (siehe Abbildung 2).



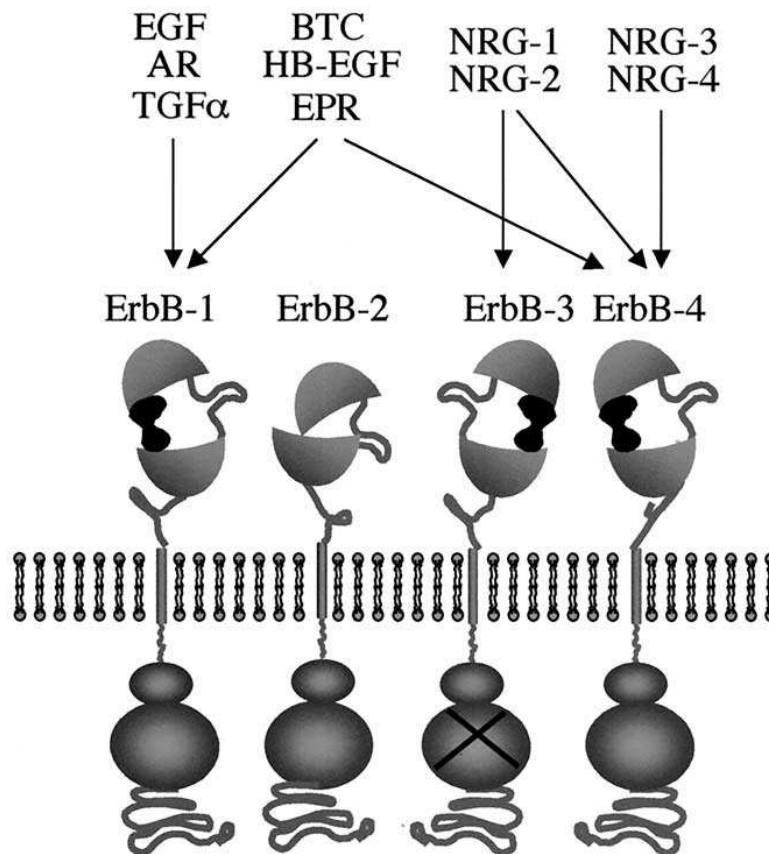


Abb. 2: Die Familie der ErbB-Rezeptoren und ihre Liganden (79)

ErbB-Rezeptoren stellen sich als transmembrane Strukturen dar, die aus mehreren Elementen bestehen. Die bei allen Untergruppen hoch homologe intrazelluläre Region enthält eine Tyrosinkinasedomäne und ein ihr angrenzendes Autophosphorylierungsende. Wie hier erkennbar, ist die Tyrosinkinasedomäne des ErbB3 katalytisch inaktiv. Die extrazellulären Domänen enthalten zwei cysteinreiche Bereiche (hier als Schleifen dargestellt), die für die ligandeninduzierte Dimerisierung verantwortlich sind. Zusätzlich findet man extrazellulär zwei cysteinfreie Domänen, die für die Bindung des jeweiligen Liganden (hier dunkel dargestellt). Hier sind 10 verschiedene Wachstumsfaktoren und ihre bevorzugten Rezeptoren dargestellt: EGF, Amphiregulin (AR) und TGFα binden an ErbB1; Betacellulin (BTC), Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) und Epireregulin (EPR) binden sowohl an ErbB1 und ErbB4; die Neureguline (auch Hereguline genannt) NRG-1 und NRG-2 binden an ErbB3 und ErbB4; NRG-3 und NRG-4 wiederum binden nur an ErbB4. Für ErbB2 ist kein Ligand bekannt. Dieser Rezeptor scheint ohne Ligandenbindung dimerisieren zu können und somit aktiv werden zu können.

Diese Liganden binden an die extrazelluläre Komponente des jeweiligen Rezeptors, die sich wiederum aus 4 Domänen (I-IV) zusammensetzt, wobei die Domänen II und IV cysteinreich sind und je etwa 10 Disulfidbrücken enthalten. Das Andocken eines Liganden führt über eine Konformationsänderung zur Freigabe eines „Dimerisierungs-Arms“ an der Domäne II, der sich an die Domäne II eines benachbarten ErbB-Rezeptors anlegt (100). Diese Bildung der sogenannten „Dimerisierungsschleife“ (siehe Abbildung 3) stellt den entscheidenden Schritt in der Signalübertragung der ErbB-Rezeptoren dar und wird als Homo- bzw. Hetero-Dimerisierung zweier Rezeptoren bezeichnet, je nachdem, ob zwei gleiche oder verschiedene Rezeptoren interagieren. Durch diese Vereinigung kommt es schließlich zur Weiterleitung des Signals über die Zellmembran und zur Aktivierung der assoziierten Tyrosinkinasen, die jeweils gegenseitig regulatorische Tyrosinreste ihres Interaktionspartners phosphorylieren (sog. Transphosphorylierung) (72). Die dadurch erreichte Erhöhung der basalen RTK-Aktivität leitet die Signaltransduktionskette innerhalb der Zelle ein (53, 100).

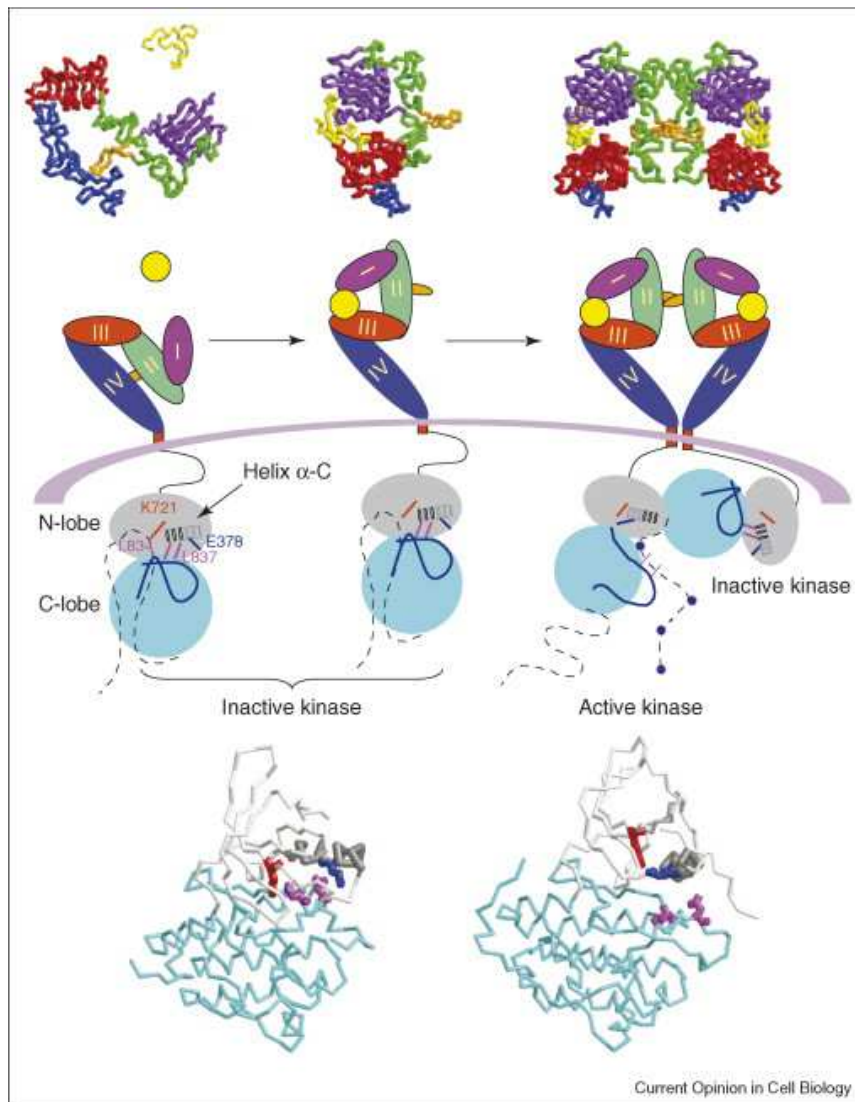


Abb. 3: Prinzip der „Dimerisierungsschleife“ (15, Fig. 2)

Hier sind die intra- und extrazellulären Domänen der ErbB-Rezeptoren sowohl dreidimensional als auch schematisch dargestellt. Die Plasmamembran ist durch einen violetten Bogen dargestellt. Im extrazellulären Rezeptorbereich sind die Domänen I bis IV farblich unterschieden. Domäne II enthält dabei die in orange gezeichnete Dimerisierungsschleife. Links: vor der Ligandenbindung sind die Domänen II und IV über die Dimerisierungsschleife miteinander verbunden.

Mitte: Bindung des Liganden (gelb) zwischen den Domänen I und III führt zu starken Konformationsänderungen, in deren Folge die Dimerisierungsschleife nun freiliegt.

Rechts: Rezeptordimerisierung über exponierte Dimerisierungsschleife.

Bei der Darstellung der intrazellulären Domänen erkennt man, dass die enthaltene Kinasedomäne erst nach Dimerisierung der extrazellulären Rezeptoranteile (rechts) aktiviert wird.

Sowohl ErbB2 als auch ErbB3 nehmen hierbei eine Sonderstellung ein. Für ErbB2 ist nämlich kein Ligand bekannt (siehe Abb. 2). Als man nun seine Ektodomäne untersuchte, fand man als Erklärung, dass hier die Verbindung zwischen den Domänen II und IV fehlt und dadurch die Dimerisierungsschleife in Abwesenheit eines Liganden konstitutionell exponiert ist. Das bedeutet, dass er unabhängig von einer Ligandenbindung befähigt ist, Homo- bzw. Heterodimere zu bilden (130). Er dient dabei als Korezeptor und ist der bevorzugte Interaktionspartner für die anderen ErbB-Rezeptoren, sobald diese durch entsprechende Liganden aktiviert wurden (41). Die Region,

die der Liganden-Bindungsstelle an den anderen ErbB-Rezeptoren entspricht, ist mutiert und aufgrund dieser sterischen Veränderungen nicht fähig, einen Liganden an sich zu binden (47, 100).

ErbB3 hingegen unterscheidet sich dadurch, dass bei ihm die Tyrosinkinase-Domäne fehlt, da die für dieses Element kodierende DNA-Sequenz im Laufe der Entwicklung verloren ging (43). Umso überraschender ist es, dass gerade Heterodimere aus ErbB2 und ErbB3 die häufigsten und in besonderer Weise in der Lage sind, proliferative Prozesse in der Zelle anzustoßen (41).

### 1.2.3 Die Signaltransduktion der ErbB-Rezeptoren

Nach Liganden-induzierter Rezeptor-Dimerisierung und darauffolgender Transphosphorylierung stehen verschiedene Signalwege zur Verfügung, über die die ErbB-Rezeptoren die externe Stimulation ins Zellinnere weiterleiten und eine spezifische zelluläre Antwort hervorrufen (38, 80). Die unterschiedlichen pathways werden durch Signalproteine eingeleitet, die über SH2- und PTB-Domänen an phosphorylierte Tyrosinreste binden. Letztendlich entscheidet die jeweilige Struktur- und Sequenzumgebung der Tyrosinreste am C-terminalen Ende der Rezeptoren darüber, welche intrazellulären Proteine binden. Da die einzelnen Homologe der ErbB-Rezeptoren genau in diesem Bereich sequenzielle Unterschiede aufweisen, gibt es für jeden Typ (ErbB1- ErbB4) bevorzugte zytosolische Signalmoleküle und folglich auch präferierte Signalwege. In Abbildung 4 erkennt man diese Unterschiede in den Tyrosinresten der einzelnen Rezeptoren und ihre bevorzugten Bindungspartner.

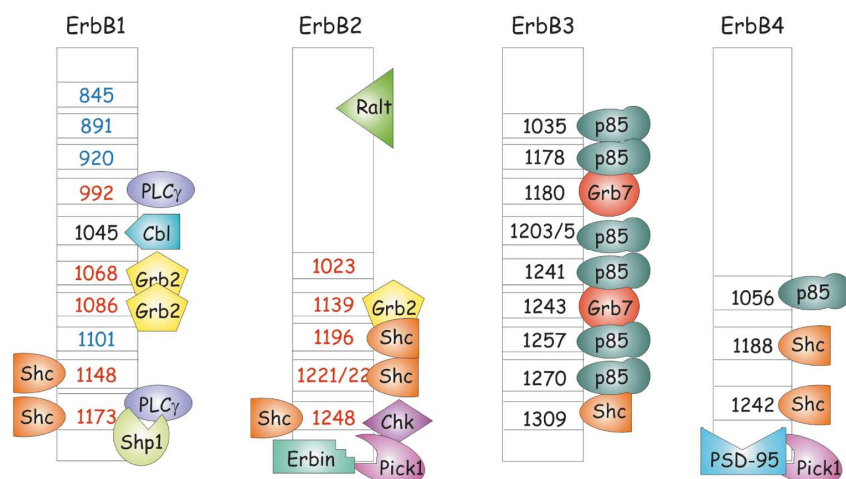


Abb. 4: Unterschiede der einzelnen ErbB-Rezeptoren in ihren Tyrosinresten und ihren intrazellulären Bindungspartnern (88). ErbB-Rezeptoren können über spezifische C-terminale Tyrosine mit verschiedenen Proteinen interagieren, die über SH2- und PTB- Domänen binden. Unterschiede in den Tyrosinresten der einzelnen ErbB-Vertreter führen dazu, dass sie jeweils verschiedene Signalkaskaden bevorzugt einleiten.

Da verschiedene Signalproteine gleichzeitig binden, ist es nicht schwer vorstellbar, dass bei Rezeptoraktivierung auch simultan mehrere Signalkaskaden ablaufen. Am wichtigsten und auch am besten untersucht ist hierbei der Ras-MAPK (*mitose-activated protein kinase*)-Signalweg, der von allen Homologen in gleicher Weise angestoßen wird und einen mitogenen Effekt auf die Zelle vermittelt (79). Der zweite Hauptsignalweg (*PI3K/Akt*) läuft über die Phosphatidyl-Inositol-3'-Kinase (PI3K) und die Proteinkinase B (PKB oder Akt), die bei Aktivierung über verschiedenste

metabolische Effekte der Apoptose entgegenwirken (79). Die PI3K setzt sich aus einer regulatorischen Untereinheit p85, die mithilfe von SH2-Domänen an die Phosphotyrosine bindet, und einer katalytischen Untereinheit p110 zusammen. Nun unterscheiden sich die einzelnen ErbB-Rezeptoren in der Aktivierung dieses Signalwegs insofern, dass EGFR und ErbB2 p85 nur über weitere Adaptermoleküle wie p120 cbl (107) binden können, während ErbB3 und ErbB4 direkte Bindungsstellen für p85 aufweisen. Dies äußert sich darin, dass ErbB3 und ErbB4 diesen Weg deutlich effektiver nutzen, stärker in die Proteinsynthese eingreifen und den anti-apoptotischen Effekt erreichen können (79, 130). Als weitere Effektorenzyme für ErbB-Rezeptor-gekoppelte Signalwege stehen die Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) und die JAK/STAT (Janus-Kinase/signal transducer and activator of transcription)-Proteine zur Verfügung.

Abbildung 5 fasst die intrazellulären Signalkaskaden der ErbB-Rezeptoren zusammen.

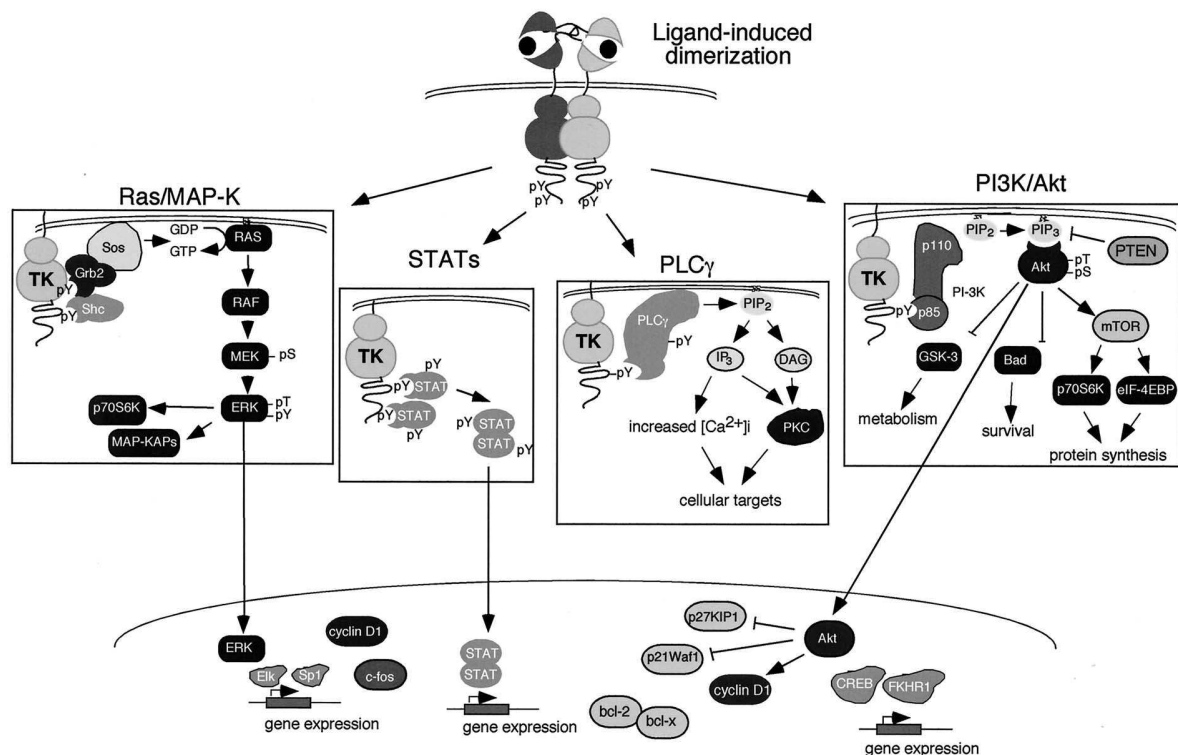


Abb. 5: Signalkaskaden der ErbB-Rezeptoren (79)

Ligandenbindung induziert Rezeptorhomo- oder -heterodimerisierung über die Dimerisierungsschleife. Dies wiederum resultiert in der Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase und der Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste am C-terminalen Ende. Signalmoleküle, die über SH2- oder PTB-Domänen binden können, werden in der Folge an aktivierte ErbBs rekrutiert und induzieren verschiedene Signalwege. Diese beinhalten den Ras-MAPK-, PI3K-Akt-, PLC-PKC- und den STAT-Signalweg, von denen jeder für sich letztendlich in Zellproliferation, -migration und -überleben mündet.

Auch wenn die einzelnen Vertreter der ErbB-Familie unterschiedliche Signalkaskaden bevorzugt in Gang setzen, darf nicht übersehen werden, in welcher engen gegenseitigen Beziehung diese Rezeptoren stehen. Nur indem sie gleichzeitig auf der Zelloberfläche exprimiert sind und sich ihrer Aktivität über die verschiedenen Kombinationen von Heterodimeren ergänzen, können sie als „funktionelle Einheit“ in vielfältigsten zellulären Prozessen wie Zellproliferation oder -differenzierung eingreifen. Zu diesen Zellfunktionen zählen auch Migration, Adhäsion, Angiogenese, Apoptose und Invasion, die eng mit maligner Transformation verknüpft sind. Dies erklärt, warum genetische oder strukturelle Aberrationen der Rezeptoren mit verschiedenen menschlichen Tumoren in Verbindung stehen (47, 100, 111).

#### 1.2.4 ErbB-Rezeptoren und ihre Rolle in der Tumorentstehung

Immer häufiger werden die Rezeptoren der ErbB-Gruppe mit der Genese von Tumoren, hauptsächlich epithelialen Ursprungs, in Verbindung gebracht. Dies machte sie in den letzten Jahren zu einem sehr attraktiven Forschungsobjekt und erfolgsversprechenden Target für neue therapeutische Strategien.

Neben einer Überproduktion an Liganden stellt die konstitutive Aktivierung von ErbB-Rezeptoren eine entscheidende Grundlage für ihr onkogenes Potential dar. Die dauerhafte Aktivität in Abwesenheit von Liganden kann entweder wie beim EGFR (ErbB1) durch multiple Mutationen der extra- bzw. intrazellulären Domäne oder wie im Falle des ErbB2-Rezeptors durch Überexpression des Rezeptors ausgelöst werden (47). Gerade der letzte Aspekt der Überexpression der ErbB-Rezeptoren spielt eine immer wichtigere Rolle in der Onkologie, wobei in der Folge schwerpunktmäßig auf den ErbB2-Rezeptor und seinen Einfluss auf die Tumorgenese des Mammakarzinoms eingegangen werden soll.

Bei 25-30% der Mammakarzinome kann eine Überexpression des ErbB2-Rezeptors nachgewiesen werden, die sich wiederum in 97 % der Fälle auf eine Genamplifikation zurückführen lässt (106, 93). Mit FRET (*fluorescence resonance energy transfer*)-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an ErbB2-Homodimeren direkt proportional zur Dichte der ErbB2-Rezeptoren auf der Oberfläche ist (84).

Bei einer Überexpression des Rezeptors kommt es folglich über eine verstärkte Homo- und auch Heterodimerisierung des ErbB2 zur konstitutiven Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege und somit zur malignen Transformation (130).

Die Heterodimerisierung geht ErbB2 dabei verstärkt mit ErbB3 ein, der in einem großen Teil der ErbB2-überexprimierenden Tumore eine erhöhte Koexpression aufweist (22). Da ErbB3 in besonderer Weise in der Lage ist, Signalkaskaden über PI3K zu aktivieren (siehe 1.2.3) und daher Heterodimere aus ErbB2 und ErbB3 am stärksten mitogen wirksam sind (siehe 1.2.2), wird einer dysregulierten Koexpression von ErbB-Rezeptoren auch ein großer Anteil an der Tumorgenese beigemessen (126, 112).

Aufgrund der häufigen Assoziation des ErbB2-Rezeptors mit Tumoren der Brust setzten sich unzählige Studien mit dem prognostischen Wert der Rezeptor-Überexpression auseinander (101). Zusammenfassend zeichnen sich Mammakarzinom mit einer Überexpression von ErbB2 durch ihr aggressiveres Wachstum aus. Das beinhaltet verstärkte Lymphknotenmetastasierung, frühzeitige hämatogene Streuung in Lunge, Leber und Knochen und deutlich erhöhte Tendenz zur Rezidivbildung. In vielen Studien zeigte sich auch ein Zusammenhang eines niedrigeren Gesamtüberlebens mit einer ErbB2-Genamplifikation (106).

All diese Punkte führten zu einem regen Interesse der Forschung, Targets gegen diesen Rezeptor zu finden und somit die Prognose dieser Tumorpatientinnen schnellstmöglich zu verbessern.

#### 1.2.5 Neue Ansätze in der Therapie des ErbB2-exprimierenden Mammakarzinoms

##### 1.2.5.1 Die monoklonalen Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab

Die pharmazeutischen Unternehmen Roche und Genentech waren die ersten, denen es gelang, einen monoklonalen humanisierten Antikörper gegen den ErbB2-Rezeptor zu entwickeln. Dieser Antikörper mit dem Namen Trastuzumab (*Herceptin*) bindet an die Domäne IV (siehe 1.2.2) des

extrazellulären Anteils von ErbB2 und zeigt dadurch vielfältige Mechanismen, auf das Zellwachstum von Tumorzellen hemmend Einfluss zu nehmen. So führt eine Behandlung mit Trastuzumab zu einer deutlichen Downregulation des ErbB2-Rezeptors, inhibiert die nachfolgende Ras-MAPK-Signalkaskade, verhindert eine ErbB-Rezeptor-Heterodimerisierung und ruft in ErbB2-überexprimierenden Zellen einen G1-Arrest hervor, der unter anderem durch eine verstärkte Expression antiproliferativer Moleküle wie p27 bedingt ist (57, 67, 50). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass dieser monoklonale Antikörper die Produktion von VEGF (*vascular endothelial growth factor*) hemmt und in der Lage ist, über den Mechanismus der antikörpervermittelten Zytotoxizität (ADCC) immunmodulatorisch zu wirken (2).

All diese positiven Effekte, die *in vitro* beobachtet werden konnten, führten nach zahlreichen klinischen Studien zur Zulassung des Präparats für die Therapie des ErbB2-überexprimierenden metastasierten Mammakarzinoms im Jahre 1998 in den USA und im Jahre 2000 in der Europäischen Union.

In der Folge belegten jedoch auch immer mehr Studien den Vorteil einer adjuvanten Trastuzumab-Therapie beim frühen, nicht metastasierten, ErbB2-überexprimierendem Mammakarzinom. So konnte 2007 die Metaanalyse fünf randomisierter Studien zur adjuvanten Trastuzumab-Therapie operabler Mammakarzinome (HERA, BCIRG-006, NSABP B-31, Intergroup N9831, FinHer) folgende Ergebnisse zeigen: eine deutliche Reduktion der Mortalität ( $p < 0.00001$ ), der Ausbildung von Rezidiven ( $p < 0.00001$ ), Metastasen ( $p < 0.00001$ ) und von Zweittumoren ( $p = 0.007$ ) bei der Trastuzumab-Gruppe (121). Diese Aufwertung des Stellenwerts von Trastuzumab hatte die Zulassung auch für die adjuvante Mammakarzinom-Therapie zur Folge.

Die entscheidende Voraussetzung für den Erfolg einer solchen Therapie ist die Überexpression des ErbB2-Rezeptors. Um die zugrundeliegende Genamplifikation des ErbB2-Gens nachzuweisen, gilt das relativ aufwendige Verfahren der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) als Methode der Wahl, wenngleich im klinischen Alltag bei vielen Patienten die kostengünstigere Immunhistochemie zum Einsatz kommt (82, 113, 114).

Trotz aller Therapieerfolge konnte inzwischen jedoch gezeigt werden, dass weniger als 35 % der ErbB2-überexprimierenden Brustkrebspatientinnen initial auf Trastuzumab ansprechen, was man als primäre Resistenz bezeichnet (123). Andererseits zeigen etwa 70 % der Patientinnen, die ursprünglich auf das Medikament angesprochen haben, ein Fortschreiten der Erkrankung bis hin zur metastasierten Situation innerhalb des ersten Jahres nach Therapiebeginn, was auf eine erworbene oder sekundäre Resistenzentwicklung hinweisen würde (123). Es gibt verschiedene Erklärungsmodelle für diese Resistenzentwicklung (123, 124, 11). Dazu gehören sterische Effekte, wie z. B. Koexpressionen von großen, membranständig exprimierten Molekülen, die die Bindung von Trastuzumab an den Rezeptor behindern. Hinzu kommt eine Vielzahl molekularer Mechanismen, die eine Resistenz in den Tumorzellen hervorrufen können. So weisen resistente Zellen z. B. einen Verlust des PTEN-Proteins auf, was zur Folge hat, dass der Akt-Signalweg konstitutiv aktiv ist und somit durch extrazelluläre Antikörperbindung nicht beeinflusst werden kann. Als dritter Punkt konnte gezeigt werden, dass die Blockade des ErbB2-Rezeptors zur Hochregulierung bzw. Aktivierung anderer RTK führt (123, vgl. Abbildung 6).

Nicht zuletzt wird immer wieder die gleichzeitige Koexpression weiterer ErbB-Rezeptoren zusätzlich zu ErbB2 als mögliche Ursache für die unterschiedliche Antwort auf ErbB2-Targeting diskutiert. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Koexpression von EGFR und ErbB3 einen entscheidenden Einfluss auf das Ansprechen von Brustkrebszellen auf ErbB2-Targeting hat (19, 29, 67, 47).

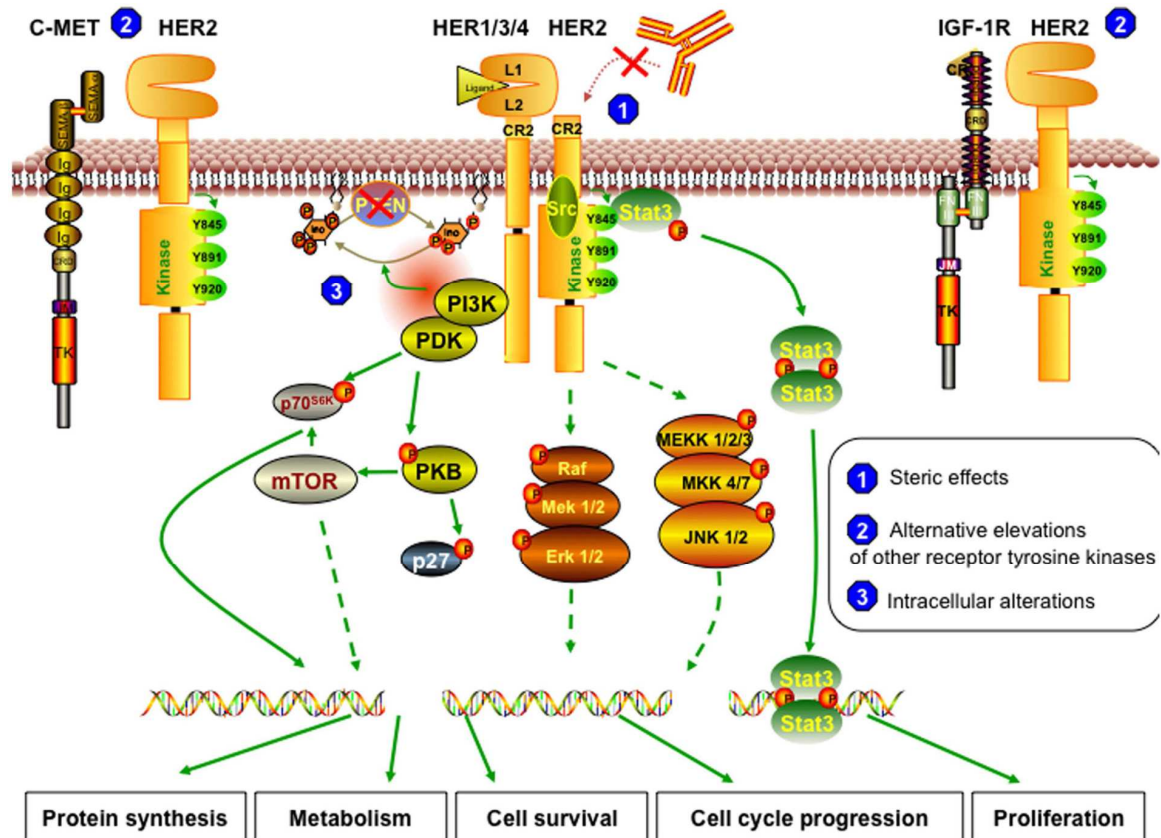


Abb. 6: Übersicht über die Resistenzmechanismen gegenüber Trastuzumab (123, Fig. 2):

- 1) Sterische Effekte oder Maskierung der Trastuzumab-Bindungsstellen: Die verkürzte ErbB2-Rezeptorvariante (p95Her2) besitzt keine Trastuzumab-Bindungsstelle und kann daher auch nicht dadurch gehemmt werden. Trotzdem kann der veränderte Rezeptor mit anderen ErbB-Rezeptoren dimerisieren und die Signalkaskaden in Gang setzen.
- 2) Reaktive Expressionserhöhungen anderer Tyrosinkinase-Rezeptoren: Die Überexpression verwandter Wachstumsfaktor-Rezeptoren, v.a. c-Met und IGF-1R, in Reaktion auf die Blockade des ErbB2-Rezeptors, kann ähnliche Effekte auf die Zellproliferation auslösen, obwohl ErbB2 durch Trastuzumab blockiert ist.
- 3) Intrazelluläre Veränderungen: In Trastuzumab-resistenten Zellen geht die Funktion von PTEN häufig verloren und somit ist der Akt-Signalweg konstitutiv aktiv. Alternativ besitzen resistente Zellen häufig mutierte PI3K- oder Akt-Varianten, die trotz Besetzung des Rezeptors durch Trastuzumab die nachgeschalteten Signalkaskaden aktivieren.

Als Folge dieser Ergebnisse wurde die Suche nach neuen Medikamenten und Therapieansätzen fortgesetzt.

Unter anderem wurde ein weiterer monoklonaler Antikörper gegen ErbB2, Pertuzumab (2C4, *Perjeta*), entwickelt, von dem man sich erhoffte, auch Patientinnen mit moderater ErbB2-Expression zu erreichen. Im Gegensatz zu Trastuzumab bindet Pertuzumab an die für die Dimerisierung entscheidende Domäne II des ErbB2-Rezeptors (siehe Abbildung 3) und kann daher sowohl die ErbB2-Homodimerisation als auch die Heterodimerisierung mit anderen ErbB-Rezeptoren verhindern (8). Aufgrund der Feststellung, dass Trastuzumab und Pertuzumab synergistisch wirken, werden sie in vielen klinischen Studien zusammen erprobt. So wurden am



07.12.2011 die Ergebnisse der ersten Phase III- Studie CLEOPATRA veröffentlicht (7). Hierbei wurde die Wirksamkeit der Kombination von Trastuzumab und Pertuzumab mit Docetaxel im Vergleich zu Trastuzumab mit Docetaxel beim metastasierten, ErbB2-überexprimierenden Mammakarzinom im Hinblick auf progressionsfreies Überleben untersucht. Hier zeigte sich eine Erhöhung des progressionsfreien Intervalls von 12,4 Monaten in der Kontrollgruppe (Trastuzumab + Docetaxel) auf 18,5 Monate, wenn zusätzlich Pertuzumab zum Einsatz kam. Dieses Ergebnis der umfangreichen Studie (808 Patientinnen), das mit keinem erhöhten Risikoprofil einherging, führte schließlich in der Europäischen Union im März 2013 zur Zulassung der Kombination Trastuzumab/ Pertuzumab/ Docetaxel für das ErbB2-positive, metastasierende oder lokal wiederkehrende, nicht operable Mammakarzinom.

Ebenfalls konnten für die neoadjuvante Anwendung die ersten Ergebnisse der Phase II- Studie NeoSphere verbesserte Ansprechraten für die Kombination aus Pertuzumab und Trastuzumab, sowohl mit als auch ohne zusätzliche Chemotherapie, zeigen (40). Die kürzlich aufgelegte APHINITY-Studie vergleicht die Wirksamkeit von Trastuzumab plus Docetaxel mit Trastuzumab plus Pertuzumab plus Docetaxel als adjuvante Therapie beim primär operablen ErbB2-überexprimierenden Mammakarzinom. Die Ergebnisse stehen zwar noch aus, es wird aber erwartet, dass die Studie entscheidend Einfluss darauf haben wird, ob eine Kombinationstherapie zukünftig auch im adjuvanten Bereich ihre Anwendung findet.

#### 1.2.5.2 Der niedermolekulare Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) Lapatinib

Auf der Suche nach neuen Therapieansätzen erkannte man frühzeitig, dass neben der extrazellulären Domäne auch die intrazellulären Tyrosinkinasen einen therapeutischen Angriffspunkt am Rezeptor darstellen. So konnten innerhalb kurzer Zeit verschiedene TKI entwickelt werden, von denen in der Folge auf den einzigen derzeit für das Mammakarzinom zugelassenen Vertreter Lapatinib (*Tykerb*, *Tyverb*) eingegangen wird.

Im Gegensatz zu den monoklonalen Antikörpern dringt dieses niedermolekulare Therapeutikum in die Krebszellen ein und blockiert die Tyrosinkinasedomäne des ErbB2- und des EGFR-Rezeptors. Dadurch kann es zwar noch zur extrazellulären Bindung von Liganden kommen, aber die nachfolgenden Signalkaskaden werden nicht in Gang gesetzt.

In zahlreichen Phase I- Studien zeigte sich bei Patienten mit verschiedensten Tumorentitäten eine deutliche Tumoreffektivität bei gleichzeitig guter Verträglichkeit, besonders beim fortgeschrittenen und metastasierenden Mammakarzinom (17). Schließlich führten die Ende 2008 veröffentlichten Ergebnisse einer Phase III – Studie zur Zulassung. Dabei kam heraus, dass bei Patientinnen mit fortgeschrittenem bzw. metastasierendem ErbB2-positivem Mammakarzinom, die bereits mit Anthrazyklinen, Taxanen bzw. Trastuzumab vorbehandelt waren, die Hinzunahme von Lapatinib zum Zytostatikum Capecitabin die Zeit bis zum Fortschreiten der Erkrankung (TTP = *time to progression*) signifikant verlängerte (18). Da sich auch ein Trend zu verbessertem Allgemeinüberleben unter Lapatinib zeigte, ist dieser Wirkstoff seitdem in Kombination mit Capecitabin bei Patientinnen mit fortgeschrittenem oder metastasierendem ErbB2-positivem Mammakarzinom zugelassen. 2010 wurde die Zulassung auf postmenopausale Patientinnen mit Hormonrezeptor- und ErbB2-positivem metastasierendem Brustkrebs ausgeweitet.

Da Lapatinib aufgrund der kleinen Molekülgröße als einziges Therapeutikum in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, wird auch seine Wirksamkeit bei Hirnmetastasen heftig



diskutiert und untersucht (6). Darüber hinaus stellt dieser duale TKI stets eine Alternative in der Therapie Trastuzumab-resistenter Mammakarzinom-Patientinnen dar.

Auch wenn der ErbB2-Gen- bzw. -Rezeptornachweis inzwischen neben dem Hormonrezeptorstatus ein wichtiges Zusatzdiagnostisches Instrument mit prognostischer Relevanz darstellt, hat eine nachgewiesene ErbB2-Überexpression keinen prädiktiven Wert für ein späteres Ansprechen auf oder eine Resistenzentwicklung gegen eine Trastuzumab-Therapie. Demnach müssen weitere Faktoren Einfluss auf die Sensitivität gegenüber Trastuzumab nehmen. Um die target-spezifische Therapie möglichst erfolgversprechend gestalten zu können, sucht man daher verstärkt nach molekularen Ursachen, die zu einer Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber der Antikörpertherapie führen. Es werden vielfältige Ursachen untersucht, wobei in dieser Arbeit der gleichzeitigen Expression weiterer Rezeptoren, wie z.B. des ErbB4- oder des Estrogenrezeptors, ein besonderer Stellenwert beigemessen wird.

### 1.2.6 Die besondere Rolle des ErbB4-Rezeptors

Der 180 kDa schwere ErbB4- bzw. Her4-Rezeptor wurde als letzter der 4 ErbB-Rezeptoren entdeckt. Was ihn als einzigen von den anderen Vertretern seiner Rezeptorfamilie unterscheidet, ist die durch Ligandenbindung ausgelöste Abspaltung einer extrazellulären und einer intrazellulären Domäne (ICD). Dies erfolgt nach dem Prinzip der sogenannten *regulierten intramembranösen Proteolyse (RIP)*, wobei nach anfänglicher Abspaltung der extrazellulären Domäne über das Enzym *TACE (TNF-alpha-converting enzyme)* die anschließende zweite Abspaltung der intrazellulären Domäne über die *γ-Secretase* getriggert wird (46, 70, 86). Da es sowohl für die extrazelluläre Domäne (JM-a und JM-b) als auch für die intrazelluläre Domäne (CYT-1 und CYT-2) zwei Splicevarianten gibt, unterscheidet man insgesamt vier in ihrer Funktion unterschiedliche Subtypen bzw. Isoformen: JM-a CYT-1, JM-a CYT-2, JM-b CYT-1 und JM-b CYT-2 (54). Die einzelnen Untergruppen und ihre funktionellen Unterschiede sind auch in der Abbildung 7 noch einmal dargestellt.

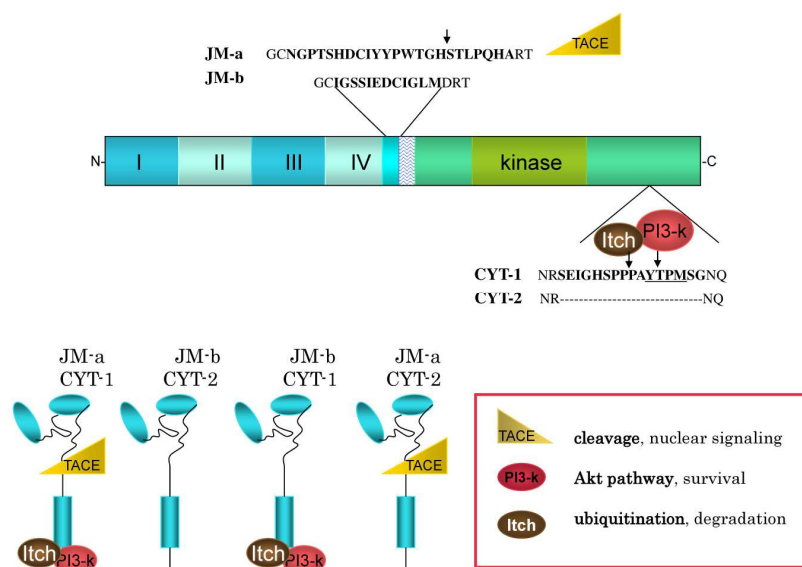


Abb. 7: Die vier Unterformen des ErbB4-Rezeptors und ihre unterschiedliche biologische Funktion (54, 48): Das ErbB4-Gen wird durch alternatives Splicing in vier verschiedene Isoformen transkribiert. Die juxtamembranösen Isoformen

entstehen entweder aus dem Exon 16, das für 23 Aminosäuren kodiert (JM-a), oder aus dem Exon 15, das für 13 Aminosäuren kodiert (JM-b). JM-a beinhaltet eine TACE-Bindungsstelle und daher kann in der Folge durch TACE und  $\gamma$ -Secretase proteolytisch eine intrazelluläre Rezeptordomäne (ICD) abgespalten werden. Die C-terminalen Isoformen enthalten entweder eine 16 Aminosäuren umfassende Sequenz von Exon 26 (CYT-1) oder nicht (CYT-2). Diese Sequenz wiederum beinhaltet Bindungsmotive für PI3-K und die Ubiquitin-Ligase Itch.

#### 1.2.6.1. Die extrazelluläre Domäne

Die Abspaltung der extrazellulären Domäne erfolgt enzymatisch über das Enzym TACE. Jedoch besteht ein Unterschied zwischen den beiden Isoformen JM-a und JM-b. Nämlich kann nur die um 3 Exons längere JM-a-Unterform vom Enzym erfasst und abgetrennt werden, während JM-b-Isoformen als Proteinase-resistent gelten (32). Die enzymatische Abtrennung führt zur Entstehung eines 120 kDa schweren extrazellulären Fragments und eines noch membrangebundenen Rezeptorstücks mit einer Größe von 80 kDa, genannt *m80*.

#### 1.2.6.2. Die intrazelluläre Domäne (4ICD)

Die CYT-1- und CYT-2-Isoform unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, intrazelluläre Signalkaskaden, wie unter 1.2.3. beschrieben, in Gang setzen zu können. Während nämlich CYT-1 über eine sogenannte *YTPM-Sequenz* direkt in der Lage ist, an PI3-K zu binden und auch zusätzliche Bindungsstellen für weitere Signalmoleküle wie *Itch* enthält (31), mangelt es CYT-2 an dieser besonderen Sequenz und somit auch an beschriebenen Eigenschaften.

Unabhängig von der Isoform besitzt die lösliche ICD nach Abspaltung durch  $\gamma$ -Secretase die Fähigkeit, in den Zellkern zu translozieren und dort als transkriptionaler Ko-Aktivator oder Ko-Repressor für verschiedene Transkriptionsfaktoren zu fungieren (74). Als einer dieser assoziierten Transkriptionsfaktoren wurde hierbei neben STAT5 (125), YAP (yes-associated protein) (61) und ETO2 (75) auch der Estrogenrezeptor (ER) beschrieben (132).

Dieser beschriebenen intrazellulären Domäne verdankt der ErbB4-Rezeptor seine ambivalente Funktion. So ist die ICD nämlich sowohl in der Lage, im Zellkern über Assoziation mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren proliferative Prozesse anzustoßen als auch in den Mitochondrien Apoptose einzuleiten und somit genau gegensätzlich zu wirken (85).

Reguliert wird die ErbB4 ICD durch eine Oxidoreduktase *Wwox*, die eine bestimmte Tumorsuppressordomäne beinhaltet (5).

#### 1.2.6.3. Expression von ErbB4-Isoformen in Normal- und Tumorgewebe

Zusätzlich zu den strukturellen und funktionellen Unterschieden der einzelnen Rezeptor-Isoformen variiert auch ihre Verteilung sowohl in gesundem als auch tumorösem Gewebe. So zum Beispiel findet man in der Niere, den Speicheldrüsen, der Trachea, der Schilddrüse, Prostata und der Brustdrüse ausschließlich die JM-a-Unterform, während im Gehirn beide Isoformen auftreten und im Herzen vor allem JM-b exprimiert wird. Die CYT-Isoformen hingegen sind stets beide in gleichem Maße vorhanden, sobald ErbB4 in gesundem Gewebe exprimiert wird. Über die unterschiedliche Expression in malignem Gewebe ist noch wenig bekannt, wobei die spaltbare JM-a-Unterform vorherrschend in Tumorgewebe exprimiert zu sein scheint. Auch hier scheint es keine Unterschiede zwischen den CYT-Typen zu geben (55, 131).

#### 1.2.6.4. ErbB4 und Brustkrebs

ErbB4 zeigt eine Assoziation mit verschiedenen Tumorentitäten, wobei sie für das Mammakarzinom mit am besten untersucht und für diese Arbeit auch von größter Bedeutung ist. Die meisten Berichte über ErbB4-positive Mammakarzinome zeigen eine Assoziation mit ER- und PgR-Positivität, ErbB2-Negativität und gut differenziertem Phänotyp (1, 44, 58). Was das Outcome von ErbB4-positiven Tumoren betrifft, findet man verschiedene, zum Teil genau entgegengesetzte Ergebnisse, was wahrscheinlich auf die zuvor angesprochene, ambivalente Funktion des ErbB4-Rezeptors zurückzuführen ist. So konnte bei ErbB4-Überexpression in manchen Studien ein erhöhtes *disease free survival (DFS)* (63) und in anderen ein erniedrigtes DFS (13) gezeigt werden. Dieses schlechtere Outcome war in vielen Fällen mit einem Nachweis von Rezeptorteilen im Zellkern verbunden (55), während Tumore mit überwiegend an der Zellmembran lokalisiertem ErbB4 eher eine positivere Prognose zeigen (5). Passend zu diesen unstimmigen Ergebnissen weisen auch Arbeiten zur Funktionsweise des ErbB4-Rezeptors eine ausgesprochene Diversität auf. Auf der einen Seite konnte belegt werden, dass der ErbB4-Rezeptor, auf der Tumorzelloberfläche exprimiert, Apoptose induzieren kann (85), auf der anderen gibt es vielfältige Beweise, dass der Rezeptor und besonders seine intrazelluläre Domäne die Proliferation von vornehmlich ER-positiven Brustkrebszellen anstößt (116, 117, 55). Als Erklärung könnten hierbei wiederum die unterschiedlichen Isoformen dienen, da für diese jeweils verschiedenen Wirkungen nachgewiesen werden konnten. Während für die spaltbare JM-a CYT2-Isoform *in vitro* eine proliferationssteigernde Wirkung gezeigt wurde (55), scheint die CYT1-Unterform zur Zelldifferenzierung und zu Apoptose beizutragen (85).

### 1.3. Der Estrogen-Rezeptor

#### 1.3.1. Estrogene in gesundem Gewebe

Die zu den Steroidhormonen zählenden Estrogene besitzen zahlreiche physiologische Funktionen im Zellmetabolismus, in der Regulation des weiblichen Zyklus und in der Ausbildung der weiblichen Geschlechtsmerkmale. Während diese Hormone und im besonderen ihr Hauptvertreter Estradiol bei prämenopausalen Frauen fast ausschließlich von den Ovarien produziert werden, erfolgt dies bei postmenopausalen Frauen vor allem in den Adipozyten.

#### 1.3.2. Estrogene und Brustkrebs

Seit mehr als 100 Jahren ist bekannt, dass die physiologisch wichtigen Estrogene auch bei der Entstehung von Brustkrebs eine Rolle spielen. Damals hat George Beatson zeigen können, dass die operative Entfernung der Ovarien bei einigen Brustkrebs-Patientinnen zur Tumorregression führte (9).

Diese Beteiligung der Estrogene in Brustkrebsentwicklung und –progression ist seitdem vielfach belegt (129, 23).

### 1.3.3. Die Estrogen-Rezeptoren

Steroidhormone können sowohl an intrazelluläre Estrogenrezeptoren als auch an den membranständigen, G-Protein-gekoppelten *GPR30* binden und somit ihre Wirkung entfalten. Bei letztgenanntem *GPR30*, der klassischerweise über 7 Transmembrandomänen in der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert ist, erfolgt die Signalweiterleitung über eine nachgeschaltete Adenylatcyclase. Diese wiederum setzt im Zellinneren verschiedene Signalkaskaden in Gang, die, ähnlich wie bei den von RTK getriggerten Signalwegen, multiple Zellfunktionen steuern. (34, vgl. 1.2.3)

Im Gegensatz zu diesem an der Zelloberfläche sitzenden Rezeptor zählen die intrazellulären Estrogenrezeptoren zur Familie der Steroidhormonrezeptoren und sind überwiegend im Zellkern lokalisiert, wo sie ihre Liganden binden. Auch von diesem Rezeptortyp existieren zwei verschiedene Unterformen: ER $\alpha$  (35) und ER $\beta$  (36). Obwohl diese beiden sowohl ihre Liganden als auch die DNA in gleicher Form binden (36), weisen sie individuelle Funktionen in der Zellregulation auf und werden von unterschiedlichen Genloci kodiert: 6q25.1 und 14q23.2 (36, 33).

In weiblichem Brustgewebe konnten beide Isoformen, ER $\alpha$  und ER $\beta$ , identifiziert werden (108). Während jedoch ER $\beta$  als Tumorsuppressor fungiert und seine Expression im malignen Gewebe abnimmt (105), trägt der ER $\alpha$  über die Transkription nachgeschalteter Genbezirke entscheidend zur Zellproliferation und –differenzierung im gesunden wie auch entarteten Gewebe bei (35). Aufgrund dieser engen Assoziation des ER $\alpha$  mit der Entwicklung und dem Fortschreiten von Mammakarzinomen wird das Gewebe von Brustkrebspatientinnen seither auf diesen Rezeptor gescreent. Ungefähr 70 % der Mammakarzinome gelten als Hormonrezeptor-positiv, wobei der Estrogenrezeptor  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) den größten Teil ausmacht (45).

Allgemein zeichnen sich ER $\alpha$ -positive Mammakarzinome durch eine deutlich geringere Mortalität als Hormonrezeptor-negative aus (30). Dies liegt nicht zuletzt daran, dass diesen aufgrund ihrer Tumorentität zusätzliche Hormontherapien zur Verfügung stehen. Um diese zu verstehen, soll zunächst die Funktionsweise der Estrogenrezeptoren etwas näher beleuchtet werden.

#### 1.3.3.1. Die Funktionsweise der Estrogenrezeptoren und das Zusammenspiel zwischen Estrogenrezeptor- und RTK-Signalwegen

Die Wirkung der Estrogene an ihrem Rezeptor wird über vier verschiedene Hauptmechanismen vermittelt, die in Abbildung 8 veranschaulicht werden.

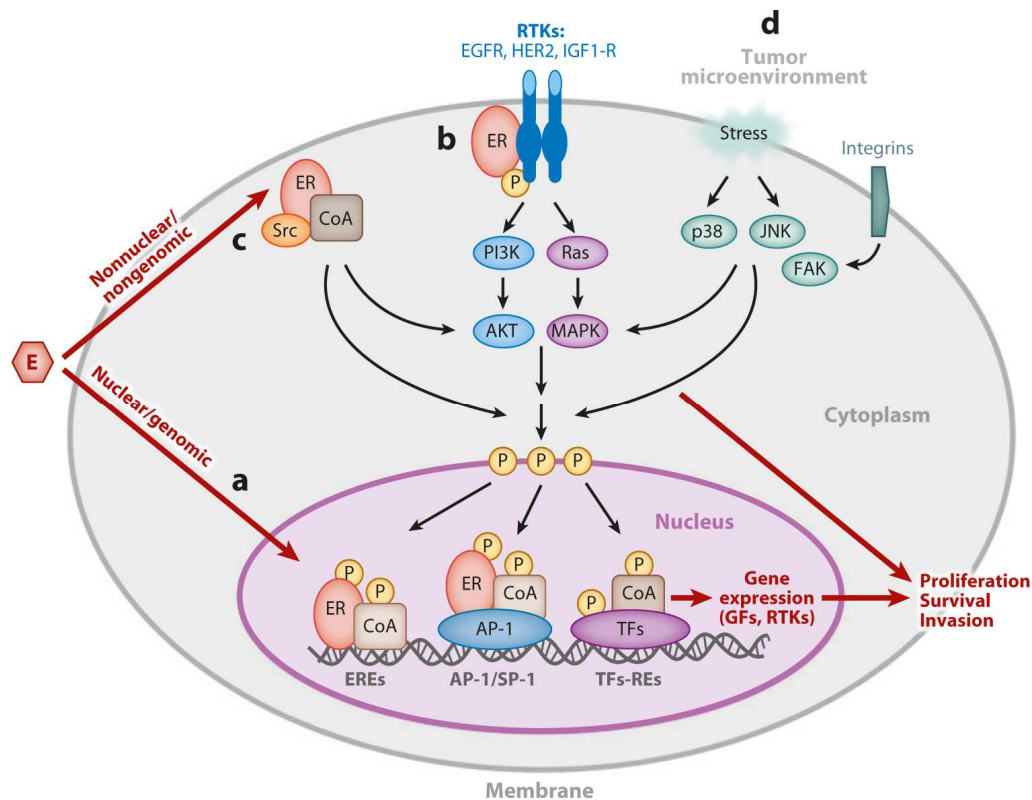


Abb. 8: Funktionsweisen des Estrogenrezeptors (91, Fig. 1)

- Der Estrogenrezeptor wird nach Kontakt mit seinem Liganden Estrogen (E) als Transkriptionsfaktor im Zellkern aktiv, indem er entweder direkt über *estrogen response elements* (EREs) oder indirekt über Protein-Protein-Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren (z.B. aus der Familie der AP-1- oder SP-1-Transkriptionsfaktorenfamilie) an die DNA-Sequenzen im Promotorbereich seiner Zielgene bindet. Unter Estrogenbindung rekrutiert der ER im Allgemeinen Koaktivator-Komplexe (CoA), um die Gentranskription in Gang zu bringen.
- Ein kleiner Anteil des ER, der außerhalb des Zellkerns und/ oder an der Zellmembran lokalisiert ist, interagiert nach Estrogenbindung mit Wachstumsfaktor-RTK wie dem EGFR, Her2 oder IGF1-R und
- mit zusätzlichen Signal- und Koaktivatormolekülen wie z.B. der Src-Kinase.  
Durch diese Interaktion werden die für Wachstumsfaktorrezeptoren typischen Signalkaskaden über PI3K/Akt oder Ras/MAPK aktiviert, die wiederum zur Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (TFs) und Koregulatoren führen, die auch in die Genregulation des ER eingreifen.
- Diese nongenomische oder extranukleäre Aktivität des ER, die vor allem bei Überexpression und Hyperaktivität von RTK eine wichtige Rolle spielt und auch zur Entwicklung endokriner Resistenzen beiträgt, kann auch durch externe Stresssignale induziert werden.

Klassischerweise binden Estrogene im Zellkern an die Estrogenrezeptoren und führen so zu deren Homodimerisierung, was wiederum die Rekrutierung von Ko-Aktivatoren und Ko-Repressoren zur Folge hat. Dieser Komplex aus Rezeptoren und Aktivatoren bindet nun an spezifische DNA-Sequenzen, die sogenannten *estrogen response elements* (ERE) im Promotorbereich der durch den ER regulierten Gene (59). Diese Regulation der Genexpression kann auch ERE-unabhängig durch Protein-Protein-Interaktion der ER-Homodimere mit anderen Transkriptionsfaktoren, z.B. aus dem AP-1- oder SP-1-Transkriptionskomplex, erfolgen (65).

Darüber hinaus wird der ER-Signalweg auch durch RTK wie EGFR, ErbB2 oder IGF1-R reguliert. Bei dieser häufig als Liganden-unabhängige Rezeptoraktivierung bezeichneten Funktionsweise des ER resultieren intrazelluläre Signalkaskaden der membrangebundenen Wachstumsfaktor-

Rezeptoren in der Phosphorylierung des ER und seiner assoziierten Ko-Aktivatoren bzw. Ko-Repressoren (104).

Diese Phosphorylierung und somit Aktivierung des Rezeptors findet auch stressinduziert durch die p38 MAPK und die c-Jun-N-Terminal-Kinase (JNK) statt (69).

All diese beschriebenen Signalwege enden schließlich in der Hoch- oder Downregulation hunderter nachgeschalteter Genbezirke, deren Endprodukte wiederum die entscheidenden Abläufe innerhalb einer Zelle steuern (37). Dazu gehören Zellproliferation, -invasion, Apoptose und Angiogenese.

Letztlich soll ein kleiner Anteil des ER, der außerhalb des Zellkerns, so zum Beispiel an der Zellmembran, im Zytoplasma oder in Mitochondrien nachgewiesen werden konnte (73), auch über einen nicht-genomischen bzw. extranukleären Signalweg funktionieren. Dieser führt ebenfalls zu einer Expressionsänderung in Genen, die normalerweise über Wachstumsfaktoren reguliert werden (103). Diese extranukleäre Komponente der ER-Funktion wird unter anderem durch Tamoxifen induziert und ist besonders bei Überexpression bzw. erhöhter Aktivität von RTK verstärkt. Dieser Signalweg trägt entscheidend zu einer Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegenüber endokrinen Therapien bei, da diese hierüber mit wichtigen Stimuli für Zellproliferation, -invasion und –überleben versorgt werden (91).

Einerseits bietet diese Vielzahl an unterschiedlichen Regulationsmechanismen des ER zwar diverse Ansatzpunkte für endokrine Therapien, andererseits wird darin auch eine mögliche Ursache für eine Resistenzentwicklung gesehen.

#### 1.3.3.2. Möglichkeiten der endokrinen Therapie

Den proliferationssteigernden Effekt von Estrogenen auf Brustkrebszellen (vergleiche 1.3.2.) macht man sich als therapeutischen Ansatzpunkt zu Nutze, indem man versucht, diese Wirkung zu antagonisieren. Dies kann entweder über eine Hemmung der Estrogenproduktion und somit einen Entzug des entscheidenden Triggers oder über eine Blockade des Estrogenrezeptors, welcher letztendlich die Wirkung des Estrogens vermittelt, erfolgen.

Da sich prä- und postmenopausale Frauen im Ort der Estrogenproduktion unterscheiden (vgl. 1.3.1.), stehen hier auch jeweils unterschiedliche Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Während auf Ebene der Estrogenproduktion bei prämenopausalen eine chirurgische Entfernung bzw. Strahlentherapie der Ovarien, dem Hauptort ihrer Estrogensynthese, oder eine Behandlung mit LHRH-Agonisten in Frage kommt, setzt man bei postmenopausalen Frauen häufig auf Aromataseinhibitoren wie *Anastrozol*, welche in peripherem Gewebe, wie z.B. Fettgewebe, die Konversion von Androgenen adrenalen Ursprungs in Estrogene verhindern.

Zur kompetitiven Hemmung des Estrogenrezeptors stehen mit den *selektiven Estrogenrezeptormodulatoren (SERMs)* wie Tamoxifen und den *selektiven Estrogenrezeptor-Downregulatoren (SERDs)* wie Fulvestrant zwei verschiedene Untergruppen zur Verfügung. Fulvestrant bindet an den ER $\alpha$  und verhindert dessen Homodimerisierung. In der Folge kommt es zur Degradation des Komplexes und somit zur Downregulation des Estrogenrezeptors. Es ist derzeit für die Therapie postmenopausaler Frauen mit ER $\alpha$ -positivem Mammakarzinom bei Nicht-Ansprechen auf Anti-Estrogen-Therapie (siehe oben) zugelassen, scheint aber auch als first-line-Therapie ER $\alpha$ -positiver Brusttumore Erfolge zu zeigen (98).

SERMs hingegen, die im Gegensatz zu SERDs vor allem bei prämenopausalen Frauen zum Einsatz kommen, tragen die Bezeichnung „Modulatoren“ aufgrund ihrer ambivalenten Funktion, dass sie

abhängig vom jeweiligen Gewebe sowohl als Agonisten als auch Antagonisten am ER wirken können. Aufgrund seiner Bedeutung für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche soll in der Folge noch näher auf Tamoxifen als Hauptvertreter der SERMs eingegangen werden.

#### 1.3.3.2.1 Der Selektive Estrogenrezeptormodulator (SERM) Tamoxifen

Seine antagonistische Funktion am ER in Brustgewebe machte Tamoxifen zur ersten zugelassenen targeted therapy des Mammakarzinoms (52). Ebenso wie Fulvestrant bindet Tamoxifen ER-Monomere und dieser Komplex rekrutiert in der Folge Ko-Repressoren anstatt von Ko-Aktivatoren (vgl. 1.3.3.1.), was sich in verlangsamten Tumorwachstum und sogar einem Rückgang der Tumorgroße äußert (96). Im Knochen- und Endometriumgewebe hingegen wirkt Tamoxifen agonistisch am ER. Dies führt einerseits zu positiven Nebenwirkungen wie einer Erhöhung der Knochendichte oder einer Reduktion von Frakturen (102), geht aber andererseits auch mit einem minimal erhöhten Risiko für Endometriumkarzinome und thromboembolische Ereignisse unter Tamoxifentherapie einher (28).

Dennoch wird Tamoxifen standardmäßig als adjuvante Therapie des ER $\alpha$ -positiven Mammakarzinoms eingesetzt und konnte sowohl im frühen als auch metastasierten Stadium große Erfolge verbuchen. So zeigt eine große Metaanalyse aus dem Jahr 2011 eine deutliche Reduktion sowohl des Rezidivrisikos (RR=0,53) als auch der Mortalität (RR=0,71) unter Tamoxifen-Therapie über die ersten 10 bzw. 15 Jahre (28). Gleichzeitig ist Tamoxifen auch zur Präventivtherapie des Mammakarzinoms zugelassen (122).

Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse wurden genauso wie für Trastuzumab auch für Tamoxifen primäre und sekundäre Resistenzentwicklungen beobachtet. Annähernd 40 % aller ER $\alpha$ -positiven Mammakarzinome sprechen initial nicht auf eine Behandlung mit Tamoxifen an (de-novo-Resistenz). Darüber hinaus haben Langzeit-Follow-Up und klinische Studien gezeigt, dass bis zu 62% der primär Tamoxifen-sensitiven Brusttumore sekundär Resistenzen entwickelten (39). Die in 1.3.3.1. aufgezeigten vielfältigen Funktionsweisen des Estrogenrezeptors bieten hierbei verschiedenste Ansatzpunkte für die Ausbildung einer Resistenz gegen endokrine Therapie. Grundsätzlich kann jede Änderung in einem der Signalwege dazu führen. Zu den beschriebenen Mechanismen für eine Resistenzentwicklung zählen unter anderem:

- ➔ Verringerung oder Verlust der ER $\alpha$ -Expression unter endokriner Therapie
- ➔ Ausbildung von ER $\alpha$ -Isoformen bzw. -Mutanten
- ➔ Änderung in der Expression von Ko-Aktivatoren und Ko-Repressoren des ER $\alpha$
- ➔ Abweichende Wachstumsfaktorrezeptor-Expression und -Aktivität
- ➔ Crosstalk zwischen ErbB-Rezeptoren und ER $\alpha$

Speziell die beiden letztgenannten Punkte spielen für diese Arbeit eine wichtige Rolle, da den Wachstumsfaktorrezeptoren der ErbB-Familie und ihren Signalwegen eine besondere Bedeutung zukommt. Mitglieder der ErbB-Familie aktivieren die PI3K- und MAPK-Signalwege, die wiederum über Phosphorylierung des ER $\alpha$  bzw. dessen Ko-Aktivatoren (z.B. AIB1) zur Aktivierung des Hormonrezeptors führen können. Dazu passen auch klinische Untersuchungen, die eine Assoziation einer ErbB2-Überexpression mit niedrigeren Tamoxifen-Ansprechraten in Patientinnen mit ER $\alpha$ -positivem Mammakarzinom belegen (97).

#### 1.4. Zielsetzung

Die Entstehung von malignen Tumoren der Brust ist multifaktoriell begründet und viele Aspekte sind bis heute noch nicht endgültig geklärt. Mit der Entdeckung der RTK der ErbB-Familie, im Besonderen des ErbB2-Rezeptors, konnte jedoch ein entscheidender pathogenetischer Faktor gefunden und gleichzeitig der Weg für einen neuen therapeutischen Ansatz, die target-spezifische Tumorbehandlung, geebnet werden. Viele verschiedene Therapeutika wurden seither entwickelt und brachten schnell Therapieerfolge für das ErbB2-überexprimierende Mammakarzinom. Inzwischen konnte jedoch gezeigt werden, dass die alleinige Überexpression des Rezeptors keine verbindliche Aussage über ein Ansprechen der Tumorzellen auf die neuen Medikamente zulässt. Vielmehr beeinflussen zahlreiche Faktoren das Ansprechen auf eine anti-ErbB2 Therapie, unter anderem die Koexpression der verschiedenen ErbB-Rezeptoren oder die des Estrogenrezeptors.

Während bekannt ist, dass der EGFR und der ErbB3-Rezeptor die Sensitivität gegenüber einem ErbB2-Targeting (negativ) beeinflussen können, ist die Rolle des ErbB4-Rezeptors bis heute noch unklar. Es gibt zwar zahlreiche Daten, die belegen, dass die RTK (insbesondere ErbB) Signalkaskaden und die des ER $\alpha$  eng miteinander verknüpft sind. Hinsichtlich einer ErbB4-Expression konnte jedoch noch nicht geklärt werden, inwiefern sich eine ErbB4/ER $\alpha$ -Koexpression dieser unterschiedlichen Rezeptorgruppen auf den Therapieerfolg einer anti-RTK- bzw. anti-ER $\alpha$ -Behandlung auswirkt.

Vor diesem Hintergrund war es Ziel dieser Arbeit, die Effekte von target-spezifischen Therapien gegen ErbB2 bzw. ER $\alpha$  in Abhängigkeit von der Expression des ErbB4 und ER $\alpha$  *in vitro* zu erfassen. Dazu wurden folgende Fragestellungen adressiert:

- Wie wirkt sich ein Knockdown des ErbB4 oder ER $\alpha$  auf die Proliferation von Brustkrebszellen aus?
- Inwieweit ist die Sensitivität ErbB2-positiver Brustkrebszellen gegenüber unterschiedlichen ErbB2-Therapeutika (monoklonale Antikörper, TKI) von der Koexpression des ErbB4-Rezeptors und des ER $\alpha$  abhängig?
- Wie wird die Sensitivität ER $\alpha$ -positiver Brustkrebszellen gegenüber dem ER $\alpha$ -Antagonisten Tamoxifen von der Koexpression des ErbB4-Rezeptors beeinflusst?

Für die experimentellen Untersuchungen wurden Brustkrebszellen der Zelllinie ZR-75-1 verwendet, die alle 3 Rezeptoren (ErbB2, ErbB4, ER $\alpha$ ) exprimieren und anhand derer innerhalb der Arbeitsgruppe bereits zahlreiche Vordaten erhoben wurden.

Im Rahmen dieser Arbeiten wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Mittels siRNA sollten sowohl ErbB4 als auch ER $\alpha$  in den Tumorzellen ausgeknockt, bzw. in hohem Maße downreguliert werden. Es sollte das Zellwachstum (bzw. die Zellproliferation) mit und ohne Koexpression der jeweiligen Rezeptoren miteinander verglichen werden.
2. Die Behandlung dieser Zellen gegen ErbB2 sollte mit den beiden monoklonalen Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab sowie dem niedermolekularen TKI Lapatinib erfolgen. Darüber hinaus sollte Tamoxifen, das mit dem ER $\alpha$  wechselwirkt, zum Einsatz kommen.



3. Die Effekte dieser Substanzen auf die Proliferation und die Vitalität der Tumorzellen sollte über zwei verschiedene durchflusszytometrische Verfahren und durch Zellzählung erfasst werden:
- a) Mittels dynamischer Proliferationsmessungen (BrdU/Hoechst-Quenching) sollte untersucht werden, ob Tumorzellen durch eine Behandlung in die G0-Phase überführt und somit in ihrer Proliferation gestoppt werden.
  - b) Mittels Apoptosemessungen (Annexin-V-FITC-Apoptose-Assays) sollte untersucht werden, ob Tumorzellen durch eine Behandlung in den Zelltod überführt werden.
  - c) Anhand quantitativer Zählungen sollte ermittelt werden, ob die jeweiligen Behandlungen die absolute Zahl von Tumorzellen (also die Tumorzellvermehrung) verringert.

Die Untersuchungen sollen dazu dienen, die Bedeutung einer Koexpression verschiedener Rezeptoren für den Behandlungserfolg target-spezifischer Therapien näher zu beleuchten. Dabei sollte der ErbB4-Rezeptor in den Fokus der Arbeiten gerückt werden, um die Bedeutung seiner Koexpression für eine anti-ErbB- bzw. eine endokrine Zellbehandlung zu evaluieren. Die Untersuchungen sollen dazu beitragen, die Rolle des ErbB4-Rezeptors als prognostischen Faktor einordnen zu können und ihn als prädiiktiven Marker langfristig in die Therapieentscheidung beim ErbB2- und/oder ER $\alpha$ - positiven Mammakarzinom mit einzubeziehen.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Zellkultur

#### 2.1.1. Verwendete Zelllinien

Im Rahmen dieser experimentellen Doktorarbeit wurde die Brustkrebszelllinie ZR-75-1 der Firma ATCC verwendet. Es handelt sich dabei um eine Zelllinie, die aus Aszites-Metastasen eines invasiven duktales Mammakarzinoms einer 63-jährigen Patientin isoliert wurde. Diese epithelialen Tumorzellen weisen einen hypertriploiden Chromosomensatz auf (109). Auf den Zellen konnte eine hohe Expression des ErbB4-Rezeptors sowie des Estrogen-Rezeptors alpha mittels Western-Blots nachgewiesen werden (Abb. 9), wobei von den verschiedenen Splice-Varianten des ErbB4-Rezeptors ausschließlich die JMa-Isoform exprimiert wird (eigene Daten). Der ErbB2-Rezeptor wird von den Zellen ebenfalls hochexprimiert, jedoch liegt bei ZR-75-1 keine *her2*-Genamplifikation vor.

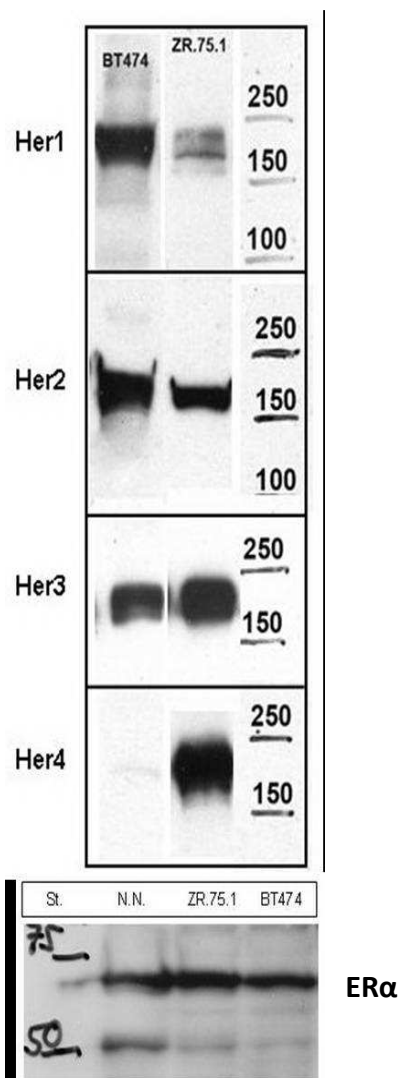


Abb. 9: Western-Blot der Brustkrebszelllinien BT 474 und ZR-75-1 zum Nachweis von ErbB1 (Her1) bis ErbB4 (Her4) und ERα (Estrogenrezeptor alpha).

Hier ist die Expression der ErbB-Rezeptoren ErbB1 bis ErbB4 (Her1 bis Her4, oben, jeweils bei einem Molekulargewicht von 180 kDa) und des Estrogenrezeptors alpha (ER $\alpha$ , unten, bei 67 kDa) in den beiden Mammakarzinomzelllinien ZR-75-1 (links) und BT474 (rechts) dargestellt. Es ist ersichtlich, dass beide Zelllinien Her1 bis Her3 exprimieren, wobei ErbB1 und ErbB2 bei den Zellen von BT474 stärkere Banden und somit eine stärkere Expression aufweisen. Während der ER $\alpha$  bei beiden Zelllinien etwa gleich stark ausgeprägt ist, kann der ErbB4-Rezeptor nur auf ZR-75-1-Zellen gefunden werden.

### 2.1.2. Die Standardkultur

Die Brustkrebszellen wurden als adhärent wachsende Monolayer in Gewebekulturflaschen verschiedener Größe (T175, T25) kultiviert und im Brutschrank inkubiert. Dort lag die Temperatur bei 37°C, der Kohlenstoffdioxidgehalt bei 5 % und der Sauerstoffgehalt bei 20 % bei gesättigter Luftfeuchtigkeit. Als Nährmedium diente RPMI-1640 (**R**oswell **P**ark **M**emorial **I**nstitute) mit 5 % fötalem Kälberserum (FKS), welches in zweitägigem Abstand gewechselt wurde. Für einzelne Versuchsansätze wurde RPMI mit Aktivkohle filtriertem FKS verwendet.

### Zellernte und Zellzahl-Bestimmung

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter der Sterilbank LaminAir Flow verrichtet. Zur Ernte wurden die Zellen zunächst mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (*phosphat buffered saline, PBS*) gewaschen, bevor sie mittels 0,25 % Trypsin und 0,02 % EDTA nach 5-minütigem Einwirken im Brutschrank vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst werden konnten. Die Menge an PBS und Trypsin/EDTA hing dabei von der Größe der Zellkulturflasche ab, so dass beispielsweise bei einer T25-Flasche, mit denen der Großteil der Versuche durchgeführt wurde, 5 ml PBS und 1,5 ml Enzymlösung verwendet wurden. Um die enzymatische Reaktion ab zu stoppen, wurden die Zellen mit FKS-haltigem Medium versetzt und anschließend die Zellsuspension in ein 50 ml-Greiner-Röhrchen überführt. Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 1200 rpm konnte der Überstand abgesaugt und das übrig gebliebene Zellpellett erneut in Medium resuspendiert werden. Mithilfe einer *Neubauer-Zählkammer*, die ungefähr 10  $\mu$ l Zellsuspension fasst, konnte die Zellzahl bestimmt werden.

Um die Zellen bis zur Färbung aufzubewahren, wurden sie nach der Ernte und Zellzahl-Bestimmung wiederum 3 Minuten bei 1200 rpm pelletiert, in kaltem Einfriermedium (RPMI-1640 + 10% FKS + 10 % DMSO) resuspendiert und abschließend in speziellen Kryoröhrchen in einer Konzentration von 1 Mio. Zellen/ ml bei -20°C eingefroren.

### Herstellung von denaturierten Zellextrakten (Zelllyse)

Damit Zellprotein in Western-Blots untersucht bzw. nachgewiesen werden konnte, mussten denaturierte Zellextrakte hergestellt werden. Dazu wurden 500.000 Zellen in eine T25-Flasche ausgesät, die nach einer Wachstumsphase von einer Woche, am gleichen Tag der Zellernte der Experimente, lysiert wurden.

Hierzu wurden die Zellen zunächst zweimal in Folge mit kaltem PBS gespült und anschließend mit 50  $\mu$ l Lysis-Puffer versetzt. Nach einer Einwirkzeit von 30 Minuten wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers abgekratzt, was die Zellmembranen zerstört. Somit wurde das Protein freigesetzt und die Zell-Protein-Suspension in ein 1,5ml-Eppendorf-Cup überführt. Nach ca. 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 13.200 rpm, wurde der Überstand in ein weiteres

Eppendorf-Gefäß gegeben. Davon wurden wiederum 5 µl für die Protein-Bestimmung mittels BCA-Test abgenommen und anschließend beide Eppendorf-Gefäße (einmal Überstand, einmal 5 µl des Überstands) bei -80°C eingefroren.

#### Downregulation eines Rezeptors mittels siRNA

Mittels siRNA wurde das Expressionslevel des ErbB4- und des Estrogen-Rezeptors herunterreguliert. Dieser Schritt erfolgte gemäß des Versuchsprotokolls am ersten Tag nach Aussaat von 500.000 Zellen in eine T25-Flasche mittels siRNA gegen den entsprechenden Rezeptor (siRNA-Stammlösung: 10µmol/l). Als Transfektionsreagenz wurde Dharmafect1 der Firma *Dharmacon* und als Kulturmedium für die Transfektion RPMI mit 1% FKS verwendet. Nachdem der Mediumwechsel erfolgt war, wurden in zwei Eppendorfcups (1,5 bzw. 2 ml) die siRNA- und die Dharmafect-Lösung getrennt voneinander hergestellt. Dabei wurden im ersten Cup (Dharmafect) pro Ansatz mit  $5 \times 10^5$  Zellen 10 µl Dharmafect1 in 190 µl serumfreiem Medium (RPMI ohne FKS) gelöst. Im siRNA-Cup wurde mithilfe von gestopften Eppendorf-Pipetten aus der siRNA-Stocklösung (10µmol/l) die Endkonzentration von 50 nmol/l hergestellt. Pro Probe wurden dazu 12,5 µl der Stammlösung in 187,5 µl serumfreiem Medium verdünnt. Je nach Probenanzahl wurden diese Volumina mit dem entsprechenden Faktor multipliziert, wobei eine kleine Reserve für Pipettierfehler mit einberechnet wurde (vgl. Tabelle 1). Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden je 200 µl der Dharmafect-Lösung in die Dharmafect-Kontrollansätze gegeben (siehe Tab. 5, 6, 7 Probe Nr.2), bevor der Rest aus diesem Cup mit der siRNA-Lösung vermischt wurde. Nach Inkubation dieser Mischung für 20 Minuten bei Raumtemperatur, wurden jedem siRNA-Ansatz (siehe Tabelle 6, Proben 3-11 und Tabelle 7, Proben 3-9) je 400 µl der Dharmafect/ siRNA-Lösung zugeführt. In der folgenden Abbildung sowie im folgenden Protokoll ist die beschriebene siRNA-Behandlung noch einmal zusammengefasst.

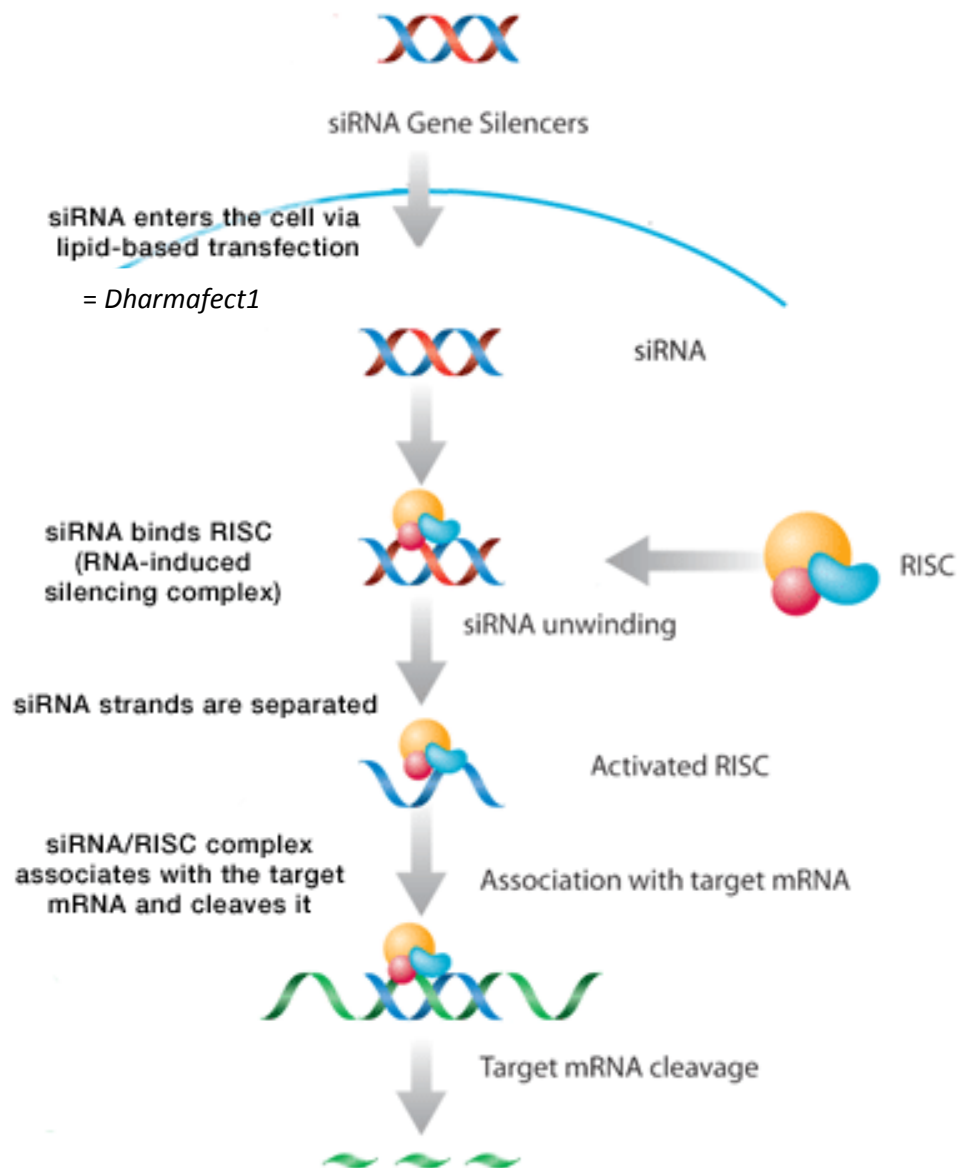


Abb. 10: Prinzip der Downregulation mittels siRNA (134)

Mithilfe eines stark lipidhaltigen Transfektionstreagens (in dieser Arbeit kam *Dharmafect1* zum Einsatz) kann die noch doppelsträngige siRNA die Zellmembran durchqueren. Nach Bindung an den sog. RISC (RNA-induced silencing complex) wird nun die doppelsträngige siRNA in ihre Einzelstränge aufgetrennt und es entsteht der aktivierte RISC-Komplex aus einsträngiger RNA und einer Ribonuklease. Dieser Komplex kann nun über den RNA-Anteil an die komplementäre Basenfolge der jeweiligen mRNA binden und in der Folge kommt es zum enzymatischen Abbau der mRNA über die angehängte Ribonuklease. Somit kann die jeweilige mRNA, gegen die die siRNA spezifisch gerichtet ist, nicht mehr transkribiert werden.

## siRNA-Behandlung

**Medienwechsel und Zugabe der siRNA je 50nM:**

**2,5ml Gesamtvolumen - RPMI+ 1% FKS/ 1% Aktivkohle filtriertes FKS**

Unbehandelte Proben	2,5ml Medium
Dharmafect-Kontrollansätze	2,3 ml Medium + 0,2 ml Dharmafect
siRNA-Ansätze	2,1ml Medium + 0,4 ml Dharmafect/ siRNA

### siRNA Verdünnung für ZR75-1 Ansätze:

- ❖ **5 nmol siRNA in 500µl Universalpuffer 1x → 10 µM siRNA stocklösung**
- ❖ Ansatz mit 500.000 Zellen in 2,5 ml Gesamtvolumen, siRNA für 24 Std
  - 1x unbehandelt
  - 2 x Dharmafect1-Kontrolle
  - 9/ 6 x siRNA gg ErbB4/ ER **50 nM**

**tube1:** 5Min/RT inkubieren

Anzahl der Ansätze	1x	9,5/ 6,5x gegen ErbB4/ ER
10µM siRNA	12,5 µl	118,75/ 81,25 µl
serumfreies Medium	187,5 µl	1781,25/ 1218,75 µl
Volumen pro Ansatz/Ansätze	200 µl	1900/ 1300 µl

**tube2:** 5min/RT inkubieren

Anzahl der Ansätze	1x	11,5/ 8,5 x (siRNA Ansätze + 2x Kontrolle + Reserve)
Dharmafect1	10 µl	115/ 85 µl
serumfreies Medium	190 µl	2185/ 1615 µl
Volumen pro Ansatz/Ansätze	200 µl	2300/ 1700 µl

- ➔ Pro Ansatz je 200 µl aus tube2 in die Dharmafect-Ansätze
- ➔ **tube1 + tube2:** 20Min/RT inkubieren
- ➔ 400 µl der Mischung pro siRNA-Ansatz zu 2,1ml vorgelegtes Medium geben

Tab. 1: Zellkultur-Protokoll für die siRNA-Behandlung in den Versuchen dieser Arbeit

Die Zellkultur-Protokolle

## a) Wildtyp-Versuchsreihe

	<b><u>Wochentag</u></b>	<b><u>Arbeitsschritt</u></b>	
Tag 0	Montag	Aussaat von 9 x T25 ZR-75-1 (500.000 pro T25 in 5 ml RPMI/ 5% FKS)	
Tag 1	Dienstag	1. Mediumwechsel (RPMI/ 1% FKS) und Zugabe von Dharmafect (0,2 ml Dhf1 + 2,3 ml RPMI/ 1% FKS)	
		2. 2 Flaschen (Nr. 8 und 9): Mediumwechsel mit RPMI/ 1% Aktivkohle filtriertes FKS (AK-FKS)	
Tag 2	Mittwoch	1. Zugabe von 2,5 ml RPMI/ 10% FKS bzw. RPMI/ 10% AK-FKS (8 und 9)	
		2. Zugabe von Trastuzumab, Pertuzumab, Lapatinib, DMSO, Tamoxifen und $\beta$ -Estradiol	Mi bis Mo = 120 h
Tag 3	Donnerstag	Zugabe von BrdU und DC	Do bis Mo = 96 h
Tag 4	Freitag	Mediumwechsel (5 ml RPMI/ 5% FKS), Nachlegen BrdU und DC, Nachlegen Stimulantien und Inhibitoren	
Tag 7	Montag	Ernte, Zellzahlbestimmung, Einfrieren in Konzentration 1 Mio./ml in Kryoröhrchen (Einfriermedium: RPMI/ 10% FKS/ 10% DMSO) bei -20°C	

Tab. 2: Zellkultur-Protokoll für die „Wildtyp-Versuchsreihe“

## b) ErbB4-Downregulation

	<b><u>Wochentag</u></b>	<b><u>Arbeitsschritt</u></b>	
Tag 0	Dienstag	Aussaat von 12 x T25 ZR-75-1 (500.000 pro T25 in 5 ml RPMI/ 5% FKS)	
Tag 1	Mittwoch	1. Mediumwechsel (RPMI/ 1% FKS) und Zugabe von Dharmafect (0,2 ml Dhf1 + 2,3 ml RPMI/ 1% FKS) bzw. siRNA gegen ErbB4 (50nM) (0,4 ml siRNA/ Dhf1 + 2,1 ml RPMI/ 1% FKS)	
		2. 2 Flaschen (Nr. 9 und 10): Mediumwechsel mit RPMI/ 1% Aktivkohle filtriertes FKS (AK-FKS)	
Tag 2	Donnerstag	Zugabe von Trastuzumab, Pertuzumab, Lapatinib, DMSO, Tamoxifen und $\beta$ -Estradiol	Do bis Di = 120 h
Tag 3	Freitag	Mediumwechsel (5 ml RPMI/ 5% FKS), Nachlegen Stimulantien und Inhibitoren, Zugabe von BrdU und DC	Fr bis Di = 96 h
Tag 4	Montag	Mediumwechsel (5 ml RPMI/ 5% FKS), Nachlegen BrdU und DC, Nachlegen Stimulantien und Inhibitoren	
Tag 7	Dienstag	1. Ernte, Zellzahlbestimmung, Einfrieren in Konzentration 1 Mio./ml in Kryoröhrchen (Einfriermedium: RPMI/ 10% FKS/ 10% DMSO) bei -20°C	
		2. 2 Flaschen (11 und 12): Zellyse und Einfrieren bei -80°C	

Tab. 3: Zellkultur-Protokoll für die Versuchsreihe „ErbB4-Downregulation“

## c) ER-Downregulation

	<u>Wochentag</u>	<u>Arbeitsschritt</u>	
Tag 0	Dienstag	Aussaat von 9 x T25 ZR-75-1 (500.000 pro T25 in 5 ml RPMI/ 5% FKS)	
Tag 1	Mittwoch	Mediumwechsel (RPMI/ 1% FKS) und Zugabe von Dharmafect (0,2 ml Dhf1 + 2,3 ml RPMI/ 1% FKS) bzw. siRNA gegen ER (50nM) (0,4 ml siRNA/ Dhf1 + 2,1 RPMI/ 1% FKS)	
Tag 2	Donnerstag	Zugabe von Trastuzumab, Pertuzumab, Lapatinib, DMSO	Do bis Di = 120 h
Tag 3	Freitag	Mediumwechsel (5 ml RPMI/ 5% FKS), Nachlegen Stimulantien und Inhibitoren, Zugabe von BrdU und DC	Fr bis Di = 96 h
Tag 4	Montag	Mediumwechsel (5 ml RPMI/ 5% FKS), Nachlegen BrdU und DC, Nachlegen Stimulantien und Inhibitoren	
Tag 7	Dienstag	1. Ernte, Zellzahlbestimmung, Einfrieren in Konzentration 1 Mio./ml in Kryoröhrchen (Einfriermedium: RPMI/ 10% FKS/ 10% DMSO) bei -20°C	
		2. 2 Flaschen (8 und 9): Zellyse und Einfrieren bei -80°C	

Tab. 4: Zellkultur-Protokoll für die Versuchsreihe „ER-Downregulation“

Entsprechend dieser Protokolle wurden die Brustkrebszellen 8 Tage lang (Dienstag bis Dienstag bzw. Montag bis Montag) kultiviert und behandelt, bevor sie am zweiten Dienstag/ Montag geerntet und eingefroren werden konnten.

Behandlung mit Wachstumsfaktoren und ErbB2-Targeting

Insgesamt wurden drei verschiedene Versuchsreihen durchgeführt:

- a) „Wildtypversuch“: unbehandelte ZR-75-1-Zellen
- b) ErbB4-Downregulation: ZR-75-1 nach ErbB4-Rezeptor-Downregulation
- c) ER-Downregulation: ZR-75-1 nach Estrogen-Rezeptor-Downregulation

Um Vergleiche verschiedener Behandlungen vornehmen zu können, wurden für die einzelnen Versuchsreihen jeweils mehrere Ansätze vorbereitet, die unterschiedlichen Stimulantien oder Antikörpern ausgesetzt wurden. Als Targets gegen den ErbB2-Rezeptor kamen sowohl die monoklonalen Antikörper Trastuzumab (*Herceptin*) und Pertuzumab (*Omnitarg*), die direkt an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors binden, als auch Lapatinib, ein niedermolekularer TKI, zum Einsatz. In weiteren Ansätzen wurden die Zellen mit dem selektiven Estrogenrezeptormodulator Tamoxifen behandelt, der den Estrogenrezeptor blockiert. Da Lapatinib in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst ist, wurde eine Kontrollflasche damit versetzt, um mögliche durch das Lösungsmittel induzierte Nebeneffekte auszuschließen. In den letzten beiden Proben des Wildtypversuchs und bei der ErbB4-Downregulation kam anstelle des normalen FKS im Medium Aktivkohle filtrierte FKS zum Einsatz. Die Aktivkohlebehandlung entfernt die enthaltenen Steroidhormone und Wachstumsfaktoren. Jeweils im letzten Ansatz, einer der beiden mit Aktivkohle behandeltem FKS, wurde den Zellen  $\beta$ -Estradiol zugesetzt, welches an den Estrogenrezeptor bindet und somit die Zellen zur Proliferation anregen sollte.



Daraus ergaben sich für die drei Versuchsreihen folgende Behandlungsschemata:

a) Behandlungsschema ZR-75-1 Wildtypversuch

Proben-Nr.	BrdU	Dhf	siRNA	BEHANDLUNG (120 h)					Aktivkohle – FKS	β-Estradiol (Aktivkohle-FKS)
				Trast	Pert	Lapatinib	DMSO	Tamoxifen		
WT 1	96h	-	-							
WT 2	96h	+	-							
WT 3	96h	+	-	+						
WT 4	96h	+	-		+					
WT 5	96h	+	-			+				
WT 6	96h	+	-				+			
WT 7	96h	+	-					+		
WT 8	96h	+	-						+	
WT 9	96h	+	-						+	+

Tab. 5: Behandlungsschema für die „Wildtypversuche“

b) Behandlungsschema ZR-75-1 ErbB4-Downregulation

Proben-Nr.	BrdU	Dhf	siRNA Her4	BEHANDLUNG (120 h)					Aktivkohle – FKS	β-Estradiol (Aktivkohle-FKS)
				Trast	Pert	Lapatinib	DMSO	Tamoxifen		
Her4_1	96h	-	-							
Her4_2	96h	+	-							
Her4_3	96h	+	+							
Her4_4	96h	+	+	+						
Her4_5	96h	+	+		+					
Her4_6	96h	+	+			+				
Her4_7	96h	+	+				+			
Her4_8	96h	+	+					+		
Her4_9	96h	+	+						+	
Her4_10	96h	+	+						+	+
Her4_11	96h	+	-	Lyse für Western –Blot						
Her4_12	96h	+	+	Lyse für Western –Blot						

Tab. 6: Behandlungsschema für die „ErbB4-Downregulation“-Versuche

## c) Behandlungsschema ZR-75-1 ER-Downregulation

Proben-Nr.	BrdU	Dhf	siRNA ER	BEHANDLUNG (120 h)			
				Trastuzumab	Pertuzumab	Lapatinib	DMSO
ER_1	96h	-	-				
ER_2	96h	+	-				
ER_3	96h	+	+				
ER_4	96h	+	+	+			
ER_5	96h	+	+		+		
ER_6	96h	+	+			+	
ER_7	96h	+	+				+
ER_8	96h	+	-	Lyse für Western –Blot			
ER_9	96h	+	+	Lyse für Western –Blot			

Tab. 7: Behandlungsschema für die „ER-Downregulation“-Versuche

Für die Behandlungen wurden Trastuzumab und Pertuzumab in einer Konzentration von 10 µg/ml (65 nmol/l), Lapatinib in einer Konzentration von 1 µmol/l und Tamoxifen in einer Konzentration von 5 µmol/l verwendet. Bei der Stimulation mit  $\beta$ -Estradiol lag die eingesetzte Konzentration bei 10 nmol/l. Die Behandlung der Zellen wurde stets am Donnerstag begonnen und Freitag sowie Montag wiederholt, bevor am Dienstag die Zellernte durchgeführt wurde. Daraus ergibt sich eine Einwirkdauer von 120 Stunden.

## 2.2 Proteinbiochemische Methoden

## 2.2.1 Die Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA-Protein-Assay-Kit

Beim BCA-Protein-Assay-Kit von Pierce macht man sich als chemische Grundlage die Biuret-Reaktion zu Nutze, bei der durch die Proteine im alkalischen Medium  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert werden. Man verwendet bei dieser Methode eine Mikrotiterplatte, auf die 10 µl der 1:10 in TE-Puffer verdünnten Proteinlysate (Herstellung siehe 2.1.2) sowie eine Proteinstandardlösung aufgebracht wurden. Als Negativkontrolle wurden 10 µl TE-Puffer verwendet. Anschließend wurden jedem Well 200 µl einer 1:50-Mischung aus der Lösung A (Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninsäure und Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid) und Lösung B (Kupfersulfat 4%), beide aus dem BCA-Protein-Assay-Kit von Pierce/ ThermoScientific, zugegeben. Nach kurzem Vermischen und anschließender Inkubation für 30 Minuten bei 37°C konnte mit dem ELISA-Reader bei 562 nm die Absorption gemessen werden. Aus den Werten der aufgetragenen Proteinstandardlösung wurde eine Eichgerade ermittelt, die wiederum als Grundlage für die Berechnung der Proteinkonzentration in den zu analysierenden Lysaten diente.

## 2.2.2 Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der im BCA-Kit zuvor quantifizierten Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mithilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, wobei bei den hier dargestellten

Versuchen vertikale Minigele (8x12 cm) in der Mini Protean Elektrophoreseeinheit der Firma Biorad zum Einsatz kamen.

Zu allererst mussten vor jedem neuen Ansatz die diskontinuierlichen Gele neu gegossen werden. Hierzu wurde die Acrylamid-Stammlösung mit Tris-HCl-Puffer und destilliertem Wasser gemischt, bevor die Polymerisation durch die Zugabe von 10%igem APS und TEMED unmittelbar vor dem Gießen ausgelöst wurde. Die Gele setzten sich aus einem Sammel (SG)- und einem Trenngel (TG) zusammen, die sich sowohl in ihrem pH (SG: 6,8; TG: 8,8) als auch in ihrem Polyacrylamidgehalt (SG: 4%; TG: 7,5%) unterschieden.

Waren die Gele nach erfolgter Polymerisation in die Laufkammer eingebracht, wurde Laufpuffer nachgelegt. Die Taschen der Gele konnten anschließend mit den gewünschten Proben und als Kontrolle mit einem Molekulargewichtsstandard befüllt werden. Durch Anlegen von Gleichspannung wurden die Proteine nun nach Größe bzw. Gewicht aufgetrennt, da sie sich in unterschiedlicher Geschwindigkeit im Spannungsfeld bewegen. Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen liefen die Proben bei 80 V so lange, bis die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel erreicht war. Zur Detektion des ErbB4- bzw. des Estrogen-Rezeptors wurde anschließend eine Spannung von 120 V angelegt. Die Dauer hing hierbei vom jeweilig zu detektierenden Protein ab, so ließ man die Apparatur für Proteine mit ca. 180 kDa (z.B. ErbB4) ca. 3-4 Stunden und bei kleineren Proteinen mit ca. 60 kDa (ER) nur 1,5 Stunden laufen.

### 2.2.3 Der Western-Blot

Der Western Blot dient der Übertragung der Proteine vom Gel auf eine Trägermembran (Polyvinylidendifluorid, PVDF). Bei der von mir angewandten Technik des „Semi-Trocken-Blottings“ musste eine bestimmte Anordnung der verschiedenen Schichten aus Membranen, Filterpapieren und Gel (siehe Tabelle 8) eingehalten werden. Dazu wurden die Gele zunächst von den Glasplatten abgelöst und für mindestens 5 Minuten in Anodenpuffer II eingelegt. Ebenso ging die PVDF-Membran für 10 Minuten in Methanol und anschließend für weitere 10 Minuten in Anodenpuffer II. Nach kurzer Benetzung der Zwischenschichten aus Whatman-Filterpapieren, pro Gel 6 bis 9, mit Anodenpuffer I, Anodenpuffer II und Kathodenpuffer konnten gemäß der Auflistung in Tabelle 8 die einzelnen Schichten übereinander auf der Anodenplatte der Fast-Blot-Apparatur der Firma Biorad platziert werden.

In der geschlossenen Apparatur wurde für 1 Stunde eine Stromstärke von 230 mA (entspricht  $1\text{mA}/\text{cm}^2$ ) angelegt.

<b><u>Kathode</u></b>
2-3 Filterpapiere in Kathodenpuffer
Polyacrylamidgel
PVDF-Membran
2-3 Filterpapiere in Anodenpuffer II
2-3 Filterpapiere in Anodenpuffer I
<b><u>Anode</u></b>

Tab. 8: Anordnung des Polyacrylamidgels, der PVDF-Membran und der Whatmann-Filterpapiere in der Blotting Apparatur

#### 2.2.4 Die Chemolumineszenz zum Nachweis der Proteine

Nach erfolgtem Blotting stand als nächster Schritt der Nachweis der Proteine mithilfe von Chemolumineszenz auf dem Programm, bei der angeregte Antigen/Antikörper-Komplexe aufgrund von Emission elektromagnetischer Strahlung nachgewiesen werden können (vgl. unten).

Zunächst musste sichergestellt werden, dass die PVDF-Membran keine freien Bindungsstellen mehr aufwies. Diese wurden durch 2-stündiges Einlegen in APT-Puffer + 2% BSA bzw. + 5% Milchpulver unter leichtem Schütteln abgesättigt. Erst dann konnte über Nacht die Inkubation mit dem Primärantikörper (*rabbit anti-human HER4/ErbB4 #4795*, Cell Signalling, monoklonal; *mouse anti-estrogen-receptor#NCL-L-ER-6F11*, Novocastra, monoklonal) in einer Verdünnung von 1:1000 für den ErbB4-Rezeptor und 1:6000 für den Estrogen-Rezeptor in Blockierungspuffer bei 4°C erfolgen. Als Ladungskontrolle diente eine  $\beta$ -Aktin-Detektion, bei der der Primärantikörper (*Rabbit anti-human  $\beta$ -Actin#A2066*, polyklonal) in einer Verdünnung von 1:4000 eingesetzt wurde.

Am folgenden Tag wurde Antikörper, der nicht an das gewünschte Antigen, in meinem Fall entweder der ErbB4- oder der Estrogen-Rezeptor, gebunden hatte, 6 x 20 Minuten mit APT-Puffer abgewaschen.

Im Anschluss daran wurde mit den passenden Sekundärantikörpern, anti-rabbit-IgG und anti-mouse HRP(*horse raddish peroxidase*)-konjugierte Antikörper von Cell Signalling, in einer Verdünnung von 1:2000 wiederum in APT-Puffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Auch hier blieb ein Teil ungebunden, der erneut durch Waschen in APT-Puffer entfernt wurde. Waren die Membranen mit der Proteinseite nach oben auf einer Kunststofffolie platziert, konnte der Chemolumineszenz-Prozess begonnen werden.

Bei der Chemilumineszenz wird letztendlich die Freisetzung von Licht gemessen, die beim Übergang eines Elektrons aus einem angeregten Zustand in ein energetisch tieferes Niveau entsteht. Der angeregte Zustand musste hierbei zunächst durch eine chemische Reaktion erreicht werden. Durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase entsteht Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), welches wiederum zu einer Oxidation und somit zur Anregung der Dicarbonylverbindung Luminol führt. Bei der Rückkehr in den energetischen Grundzustand wird schließlich Licht freigesetzt, welches detektiert werden kann.

Für die Auslösung dieser Reaktion kam bei meinen Experimenten das ECL (enhanced chemiluminescence)-Kit von Amersham zum Einsatz. Eine Mischung der beiden Reagenzien A und B des Kits (A: 1,95 ml, B: 50 ml) wurde dabei auf die Proteinseite der PVDF-Membranen gegeben und nach 2 Minuten wieder abgegossen, bevor luftblasenfrei eine zweite Folie aufgebracht werden konnte. Auf diese kam wiederum für wenige Sekunden ein Röntgenfilm, der in der Dunkelkammer entwickelt wurde und somit das Ergebnis der Chemolumineszenz festhielt.

#### 2.2.5 Auswertung der Western-Blot-Filme mit ImageQuant

Durch Einscannen und Speichern als *tif*-Datei konnten die entwickelten Filme digitalisiert und somit mithilfe der Software *ImageQuant 5.2* der Firma GE Healthcare ausgewertet werden.

Dieses Programm ersetzt die früher notwendige densitometrische Auswertung, indem es die Schwärzung einzelner Banden quantitativ ermittelt.

Dadurch konnte sowohl jede Einzelbande mit der dazugehörigen  $\beta$ -Aktin-Kontrollbande verrechnet werden als auch die Einzelbanden untereinander verglichen werden. Dies wurde in dieser Arbeit hauptsächlich dazu verwendet, den Grad der Downregulation eines Rezeptors zu ermitteln (vgl. 3.1).

## 2.3 Durchflusszytometrische Analyse

### 2.3.1 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus eukaryotischer Zellen lässt sich seit Howard und Pelc (49) in eine Interphase und eine Mitosephase unterteilen. Die Interphase gliedert sich weiter in eine G1-, eine S- und eine G2-Phase auf, die dem Zellwachstum durch Protein- und RNA-Synthese (G1), der DNA-Replikation (S) und der Vorbereitung auf die eigentliche Zellteilung durch Verdoppelung der Zellorganellen (G2) dienen. Während der Mitose (M-Phase), die wiederum die Einzelphasen der Pro-, Ana-, Meta- und Telophase umfasst, kommt es dann zur endgültigen Zellteilung, der sog. Cytokinese, bei der 2 Tochterzellen mit identischem Erbgut entstehen. Dieser Schritt nimmt meist nur wenige Minuten in Anspruch und wird daher häufig mit der G2-Phase zur G2M-Phase zusammengefasst. Die Abbildung 11 soll diesen sich ständig wiederholenden Ablauf des Zellzyklus, dessen Dauer von wenigen Minuten bis zu einem Jahr reichen kann, verdeutlichen. Sowohl äußere Faktoren, wie das Angebot an Nährstoffen bzw. die Zelldichte bei in vitro-Versuchen, als auch innere Faktoren, wie der DNA-Gehalt oder spezielle Promoting-Faktoren (z.B. MPF, *mitose-promotingfactor*), entscheiden an definierten Kontrollpunkten über das Eintreten in den nächsten Zellzyklusschritt. Die zwei wichtigsten Kontrollpunkte sind hierbei während der G1-Phase und am Übergang von der G2- zur M-Phase eingebaut (16). Unter anderem sorgen Komplexe aus Cyclinen und sog. CDK (*cyclin-dependent kinases*), Tumorsuppressorproteine oder Proto-Onkogene für die Ausmusterung zu großer oder beschädigter Zellen. Während des ersten Restriktionspunkts in der G1-Phase können Zellen, die nicht genügend Wachstumsfaktoren erhalten oder nicht mehr ausreichend stimuliert werden, entweder in eine ruhende Phase, die sog. G0-Phase, übergehen, oder aber apoptotisch werden. Der Anteil der Zellen in der G0-Phase nimmt trotz erhaltener Zellfunktion nicht mehr aktiv am Zellzyklus teil und zeichnet sich durch einen erniedrigten Stoff- und Energieumsatz aus (66, 92). Dennoch ist eine Rückkehr dieser ruhenden Zellen in den Zellzyklus möglich, wenn entsprechende Kompetenzfaktoren (para- bzw. endokrine Wachstumsfaktoren wie EGF, *epidermal growth factor*) vorhanden sind (66, 92). Da es ein Hauptziel einer Antikörper-Behandlung von Krebszellen ist, deren Proliferation zu stoppen bzw. Zelltod herbeizuführen, spielte in meinen FACS-Messungen die Ermittlung des Anteils an Zellen in G0 (siehe 2.3.8) und von apoptotischen Zellen (siehe 2.3.9) eine herausragende Rolle.

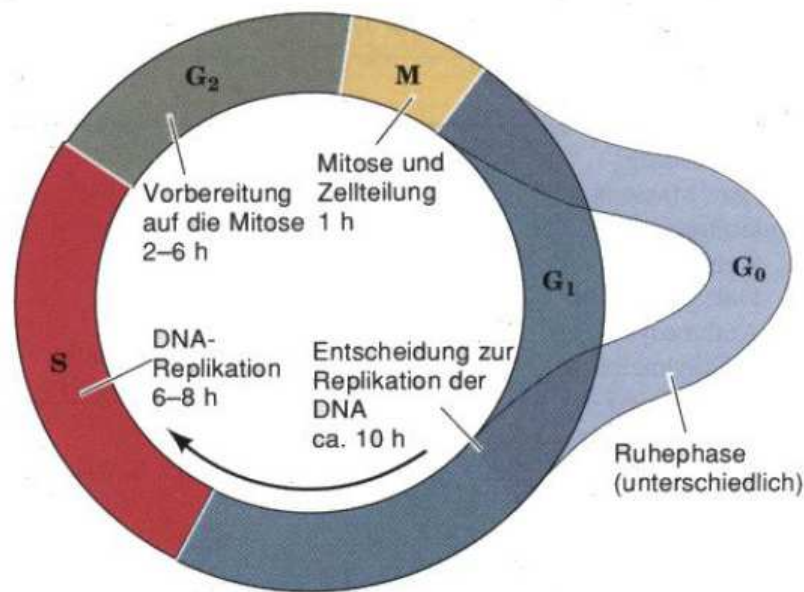


Abb. 11: Zellzyklus eukaryotischer Zellen: Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase können in die G<sub>0</sub>-Phase übergehen. Ein Restriktionspunkt befindet sich am Ende der G<sub>1</sub>-Phase, ein Kontrollpunkt zwischen der G<sub>2</sub>- und der M- Phase. Dargestellt sind die durchschnittlichen Zeiten der einzelnen Phasen.

### 2.3.2 Färbung der Zellen für Quenching-Messungen

Die nach der Ernte bei -20°C eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend je etwa 500.000 Zellen pro Ansatz in ein FACS-Röhrchen gegeben. Nach 2-maligem Waschen mit DNA-Waschpuffer (DNA-Puffer/0,2 % BSA) wurde jede Probe in 497 µl DNA-Färbepuffer resuspendiert und für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden pro Röhrchen 3 µl des Nukleinsäureinterkalators Propidiumiodid (PI) in der Konzentration von 0,25 mg/ml zugegeben. Erneut für mindestens 15 Minuten bei -20°C im Kühlschrank inkubiert, konnten die Proben am Durchflusszytometer bei einer Durchflussrate von etwa 300 events/s vermessen werden.

### 2.3.3 Gewinnung und Färbung der Zellen für Annexin-Messungen

Im Gegensatz zu Quenching-Messungen mussten die Zellen für den Annexin-Assay unmittelbar nach der Ernte gefärbt werden. Da bei dieser Apoptose-Messung auch die abgestorbenen Zellen im Überstand eine Rolle spielen, wurde dieser nicht verworfen, sondern in einen 50 ml-Greiner Röhrchen überführt. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 1,5 ml Trypsin/ EDTA abgelöst und ebenfalls in das Greiner Röhrchen gegeben. Dann wurden pro Ansatz weitere 5 ml PBS zugeführt und die Proben bei 4°C für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 45 µl Annexin-V/FITC-Lösung (1:10 in Bindungspuffer 1-fach verdünnt) resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Bindungspuffer 1x und Überführen der Lösung in ein FACS-Röhrchen mussten unmittelbar 1 Minute vor der FACS-Vermessung 3 µl PI in der Endkonzentration 0,25 mg/ml (Stockkonzentration: 1 mg/ml) zugegeben werden.

### 2.3.4 Durchflusszytometrische Fluoreszenzanalytik

Als Haupttechnik zur Evaluierung der Effekte der Antikörperbehandlung auf den Zellzyklus kam in der vorliegenden Arbeit die Durchflusszytometrie zum Einsatz. Das grundsätzliche Prinzip besteht darin, dass suspendierte Einzelzellen von einem bzw. mehreren Lasern verschiedener Wellenlängen angeregt werden und in Folge charakteristische Lichtsignale aussenden, abhängig von ihrer Größe, ihrer Gestalt, ihren Oberflächeneigenschaften oder ihrer spezifischen Anfärbung. Diese Färbung erfolgt im Voraus mit speziellen Fluorochromen oder Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern, deren chemische Eigenschaften bekannt sind. Die emittierten Signale wiederum werden detektiert, elektronisch umgewandelt und können in der Folge am Computer quantitativ dargestellt werden. Beispielsweise lassen sich somit Zellen nach ihrem DNA-Gehalt oder ihrer Antigen-Expression differenzieren.

### 2.3.5 Das Durchflusszytometer FACSCanto II

Es wurde mit dem FACS Canto II der Firma *BD Biosciences* gearbeitet, welches sich aus einem Flüssigkeitssystem, einem optischen System und einem elektronischen System zusammensetzt. Das Flüssigkeitssystem sorgt dafür, dass die suspendierten Zellen in die Durchflussküvette gesaugt und „wie im Gänsemarsch“ eine nach der anderen am gebündelten Laserstrahl vorbeigeführt werden. Durch laminare Strömung nach dem Prinzip der „Hydrodynamischen Fokussierung“ wird verhindert, dass sich Trägerflüssigkeit und Probenlösung vermischen.

Durch das optische System wird Licht in die Durchflussküvette gebracht und anschließend das von den Zellen emittierte bzw. gestreute Licht erfasst. Die Anregung der Zellen erfolgt in diesem Gerät über 3 Laser, einen violetten 405 nm-Diodenlaser (Leistung 30 mW), einen blauen 488 nm-Feststofflaser (Leistung 20 mW) und einen luftgekühlten roten 633nm-Helium-Neon-Ionenlaser (Leistung 17 mW), deren Strahl über verschiedene Prismen und eine Linse direkt auf die Zellen in der Küvette gelenkt wird. Die im verwendeten Gerät vorhandene 4-2-2-Konfiguration der Detektionsoptik ermöglicht es, gleichzeitig 8 Fluoreszenzsignale, 4 vom blauen und je 2 vom roten und vom violetten Laser, zu erfassen. Dies funktioniert über sogenannte Photomultiplier (PMT, *Photomultiplier Tools*), von denen vier in einem Achteck für den blauen Laser und in je einem Dreieck zwei für den roten und eine für den violetten Laser angeordnet sind. Erreicht ein Lichtstrahl eine Detektionseinheit, lässt ein Langpassfilter das Licht der höchsten Wellenlänge zum ersten PMT durch und reflektiert Licht niedriger Wellenlänge zum nächsten Spiegel, der wiederum die nun höchste Wellenlänge passieren lässt und niedrigere reflektiert. Die Abbildung 12 soll dieses Prinzip verdeutlichen. Neben den Fluoreszenzen werden auch das Vorwärtsstreulicht (*forwardscatter light, FSC*) und das Seitwärtsstreulicht (*sidescatter light, SSC*) registriert, die Aufschluss über die Größe bzw. die Granularität der Zellen geben. Während die Erfassung und Umwandlung für das SSC genau wie für die Fluoreszenz durch einen Photodetektor im vorher beschriebenen Achteck erfolgt, wird das stärkere FSC über eine Photodiode detektiert und an den Computer übertragen. Pro Assay können somit 8 Fluoreszenzmarker und zwei Streulicht-Parameter gleichzeitig analysiert werden (83).

Dabei macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass jeder Farbstoff ein individuelles Emissionsmaximum aufweist, auch wenn unterschiedliche Farbstoffe von gleichen Wellenlängen angeregt werden. Somit ist gewährleistet, dass entsprechend kombinierte Farbstoffe bei unterschiedlichen Wellenlängen erfasst werden können. Für die in dieser Arbeit durchgeführten

Experimente kamen in den Quenching-Messungen PI und Hoechst 33258 und bei den Apoptose-Messungen FITC (*Fluoresceinisothiocyanat*) und ebenfalls PI als Farbstoffe zum Einsatz. Tabelle 9 gibt Aufschluss über die verwendeten Farbstoffe, ihre Absorptions- bzw. Emissionsmaxima, die Anregungswellenlinien und die zugehörigen Filter und Spiegel.

<b>FARBSTOFF</b>	<u>Absorptions- maximum (nm)</u>	<u>Emissions- maximum (nm)</u>	<u>Anregungs- wellenlinie (nm)</u>	<u>Spiegel</u>	<u>Bandpass- Filter</u>
<i>PI</i>	536	617	488	DCLP470	585/42
<i>Hoechst 33258</i>	345	478	405	DCSP553 -> DCSP595	450/50
<i>FITC</i>	495	519	488	DCLP502	530/30

Tab. 9: Übersicht über die in den Versuchen eingesetzten Fluorochrome, ihre Absorptions- sowie Emissionsmaxima, die jeweilige Anregungswellenlinie, die verwendeten Spiegel und Bandpass-Filter.

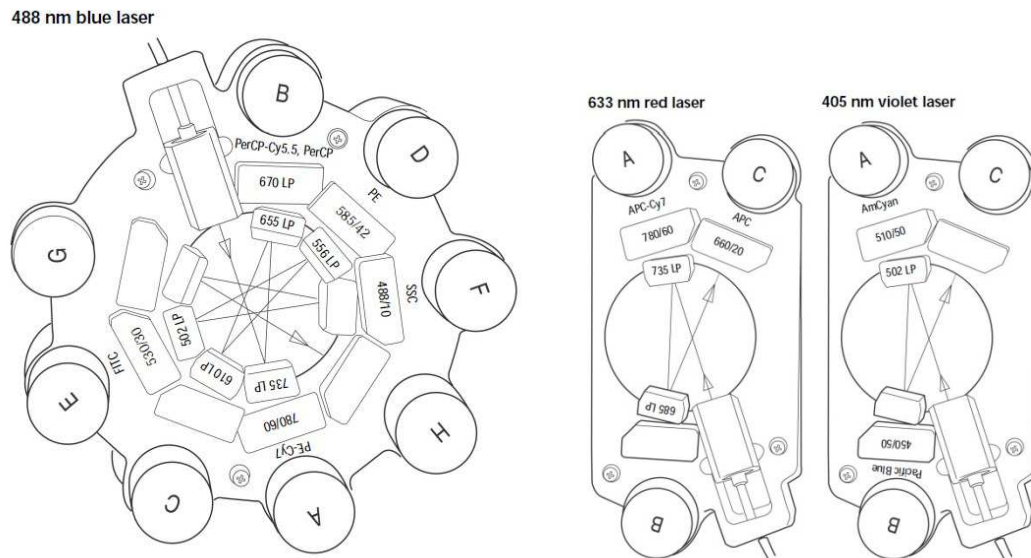


Abb. 12: Anordnung der PMTs, Langpassfilter und Spiegel für die drei verschiedenen Laser (links blau, Mitte rot, rechts violett) im FACS Canto II (83)

### 2.3.6 Standardsoftware

Sämtliche durchflusszytometrische Rohdaten wurden mit der Software FACSDiva 6.2 der Firma BD Biosciences auf einem Personal Computer erhoben und anschließend auf einen Standard-PC zur genauen Auswertung übertragen. Die Rohdaten zu jeder gemessenen Probe lagen dabei als *list-mode* Datenfiles FCS 2.0 bzw. 3.0 (*Flow Cytometry Standard 2.0/ 3.0*) vor.

Sowohl die Daten für die Quenching-Ergebnisse als auch für die Annexin-Assays wurden schließlich mithilfe des Programms FlowJo 7.6 ausgewertet.

### 2.3.7 Datendarstellung und Datenverarbeitung

Zur graphischen Darstellung wurde zunächst von jedem gemessenem Ereignis in einem zweidimensionalen Dot- bzw. Density-Blot das Seitwärtsstreulicht-Signal (FSC) gegen das



entsprechende Vorwärtsstreulicht-Signal (SSC) aufgetragen. In diesem Diagramm konnten nun die intakten, vitalen Zellen von Zelltrümmern und Farbstoffaggregaten (Debris) als auch von verklumpten Zelldubletten oder größeren Aggregaten unterschieden und durch Einschließen in eine Region herausgefiltert werden. Denn Zelltrümmer und Debris zeichnen sich durch ihr schwächeres SSC- und FSC- Signal aus, während Dubletten aufgrund ihrer Größe und höheren Granularität höhere Werte aufweisen und daher im Blot bei höheren Signalintensitäten (weiter rechts bzw. oben) erscheinen. Die angesprochene Region, die nun die lebenden Zellen beinhaltetete, wurde als Gate definiert. Dadurch konnten in weiteren Dot-Blots die eingeschlossenen Zellen noch näher differenziert werden. Bei den Quenching-Messungen wurden beispielsweise über Pulsprozessoren alle noch verbliebenen Zelldubletten aussortiert. Das Prinzip besteht darin, dass hierbei neben der Signal-Intensität (Höhe H) auch die Dauer eines Signals (Weite W) und das Integral des Peaks (Fläche A) gemessen werden können. Da Dubletten im Vergleich zu Einzelzellen mehr Zeit benötigen, den Laserstrahl zu durchqueren, zeichnen sich diese durch ein höheres Weiten-Signal aus, wie in Abbildung 13 ersichtlich wird. Dies macht man sich zu Nutze, indem man in einem Density-Blot die Signal-Fläche gegen die Signal-Weite aufträgt und somit die Dubletten aufgrund ihrer Größe im Blot weiter rechts erscheinen. Durch erneutes Setzen einer entsprechenden Region konnte nun sichergestellt werden, dass ausschließlich Einzelzellen in die anschließende Auswertung einbezogen wurden (siehe Abb. 13).

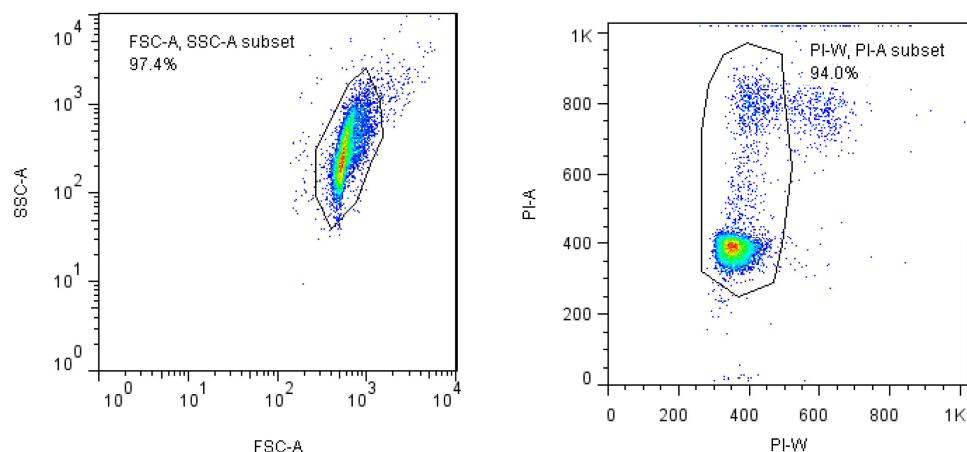


Abb. 13: Originalbilder vom FACS Canto II, bearbeitet mit *FlowJo*

Links: Aufgetragen ist hier das Seitwärtsstreulicht- (SSC-A) gegen das Vorwärtsstreulicht- Signal (FSC-A), wodurch die Zellen nach Größe und Granularität unterschieden werden können. Durch entsprechendes Gating (FSC-A, SSC-A subset) konnten Zelldubletten und Zelldebris ausgeschlossen werden.

Rechts: Aus den zuvor ausgewählten Zellen konnten letzte Zelldubletten durch erneutes Gating aussortiert werden. Bei der Auftragung des PI-Flächensignals gegen das PI-Weitensignal zeigen Zelldubletten ein höheres Weitensignal als Einzelzellen und fallen daher aus dem Raster.

### 2.3.8 Die BrdU/Hoechst-Quenching Technik

Um die Vorgänge im Zellzyklus nachvollziehen zu können, wurde die sogenannte BrdU/Hoechst-Quenching Technik angewandt (64). Die Grundlage besteht darin, dass Zellen über längeren Zeitraum kontinuierlich mit dem Nukleosidanalogon Bromdesoxyuridin (BrdU) versetzt werden, welches in der S-Phase anstelle von Thymidin in die neu synthetisierte DNA eingebaut wird.

Da der verwendete Farbstoff Hoechst an Adenin-Thymin-Basenpaare (AT) der DNA bindet (76), ist sein Fluoreszenzsignal bei Zellen, die anstelle von Thymidin BrdU aufweisen, verringert. Diese Verringerung der Hoechst-Intensität durch BrdU wird als *Quenching*-Effekt bezeichnet. Im Gegensatz dazu hängt die Fluoreszenzintensität des zweiten Farbstoffs PI nicht von der Behandlung mit BrdU ab.

Durch Auftragen der PI-Fluoreszenz gegen die Hoechst-Fluoreszenz lassen sich bis zu 3 aufeinanderfolgende Zellzyklen von asynchron wachsenden Zellen differenzieren und gleichzeitig ihr Zellzyklusstadium (G0, G1, S, G2M) einordnen (64, 89).

Die Abbildung 14 zeigt, wie sich die beiden Fluoreszenzen ohne Behandlung mit BrdU verhalten. Es kommt zu einem stetigen Anstieg beider Signale, was einem normalen Zellzyklusverlauf von G1 über S zu G2M entspricht.

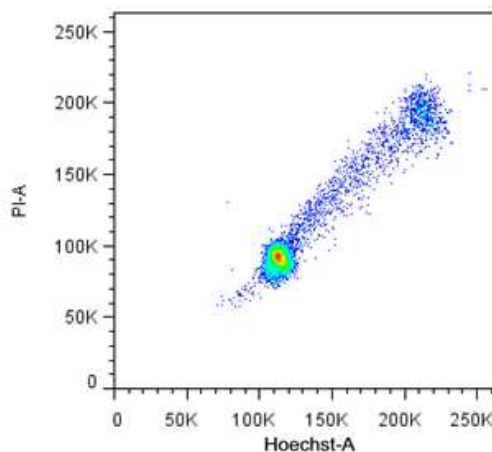


Abb. 14: Ohne Behandlung mit BrdU steigen sowohl das Hoechst- als auch das PI-Signal innerhalb eines Zellzyklus stetig an.

Demgegenüber steht die Abbildung 15 der Zellen nach 96-stündiger BrdU-Behandlung, in der man nun die einzelnen sukzessiven Zellzyklen voneinander unterscheiden kann.

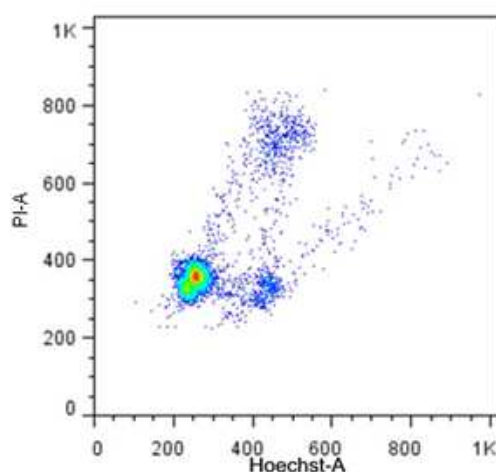


Abb. 15: Nach 96-stündiger BrdU-Behandlung der Zellen können einzelne Zellzyklen voneinander unterschieden und der Quenching-Effekt erkannt werden.

In der Abbildung 16 ist der vorher genannte Quenching-Effekt (64) ebenfalls in schematischer Form dargestellt. Man erkennt innerhalb des Zellzyklus A eine Abnahme des Hoechst-Signals bzw. eine Zunahme des Quenching-Effekts von BrdU auf Hoechst, da nun bereits mehr BrdU in die Zellen eingebaut wurde und deshalb zeigt die Zellverteilung nach links (von G0 zu G2M). Gleichzeitig erhöht sich jedoch das Signal für PI, da im Verlauf des Zellzyklus die DNA-Menge zunimmt und somit auch mehr PI interkalieren kann (89). Dies wird durch den Anstieg der Spur nach oben zu höheren PI-Signalen ausgedrückt. Die am Ende des ersten Zellzyklus stattfindende Zellteilung führt dann zu einer Halbierung der DNA und somit auch der Fluoreszenzintensität beider Farbstoffe (von G2M zu G1'). Im nächsten Zellzyklus nimmt die BrdU-Menge immer noch zu, prozentual jedoch deutlich weniger als im ersten Zellzyklus, da die Hälfte der Zellen bereits BrdU eingebaut hat. Dies führt zu einer leichten Erhöhung der BrdU-Fluoreszenz in den Zellzyklen B und C, die beide parallel zum Liegen kommen und nach rechts oben verlaufen.

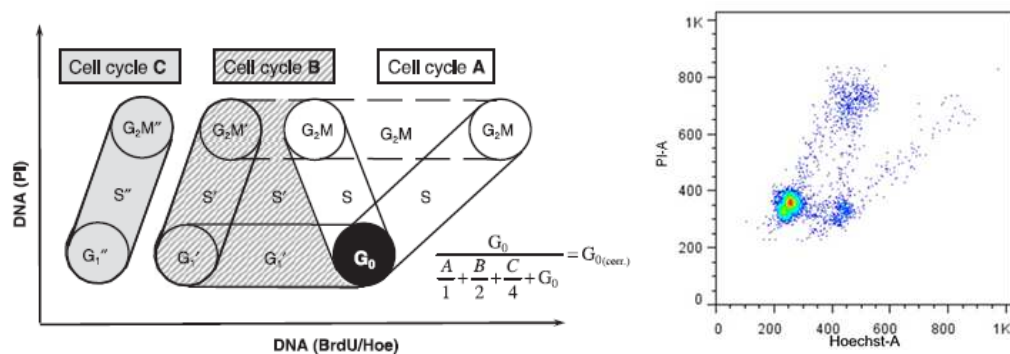


Abb. 16: Schematisches (links) und Originalbild (rechts) zur Darstellung des Quenching-Effekts.

Neben der Differenzierung der einzelnen Zellzyklus-Phasen kann man mit dieser Technik auch den Anteil der in GO ruhenden Zellen bestimmen. Diese durchlaufen nämlich im Gegensatz zu allen proliferierenden Zellen die einzelnen Zellzyklen nicht und finden sich daher nach 96-stündiger BrdU-Behandlung am Startpunkt der G1-Zellen des ersten Zellzyklus (G0).

Durch entsprechendes Gating (siehe Abbildung 17) im Dot-Blot erhält man die prozentualen Anteile der Zellen in G0, im ersten Zellzyklus, im zweiten Zellzyklus und, falls vorhanden, im dritten Zellzyklus.

Die korrigierte vergleichbare GO-Fraktion berechnet sich dann nach folgender Formel:

$$G0\text{ korrr} = \frac{G0G1}{G0G1 + ZZ1 + \frac{ZZ2}{2} + \frac{ZZ3}{4}}$$

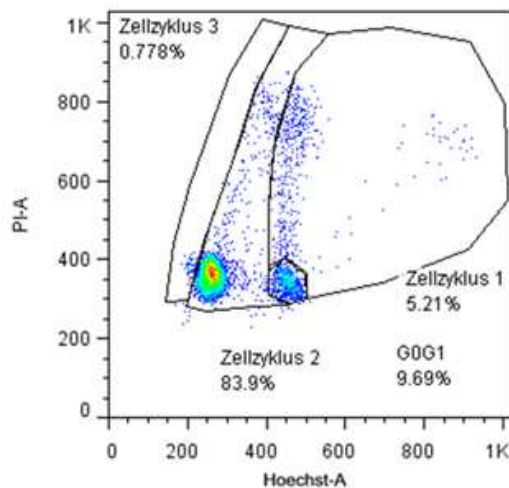
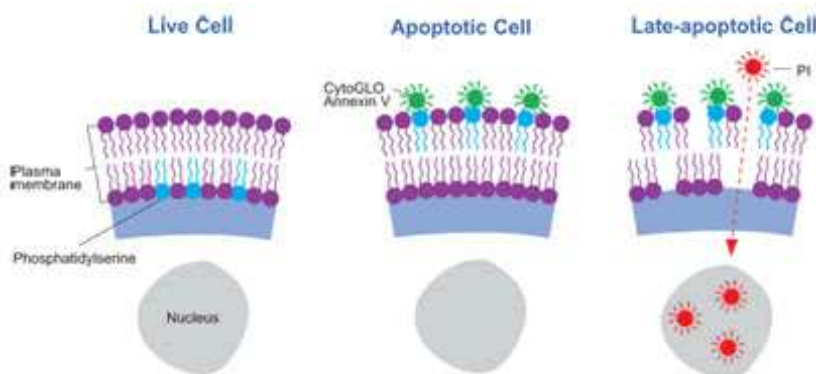


Abb. 17: Originalbild zur Darstellung des endgültigen Gatings im Hoechts-PI-Blot, das als Grundlage zur Berechnung der korrigierten G0-Fraktion diente.

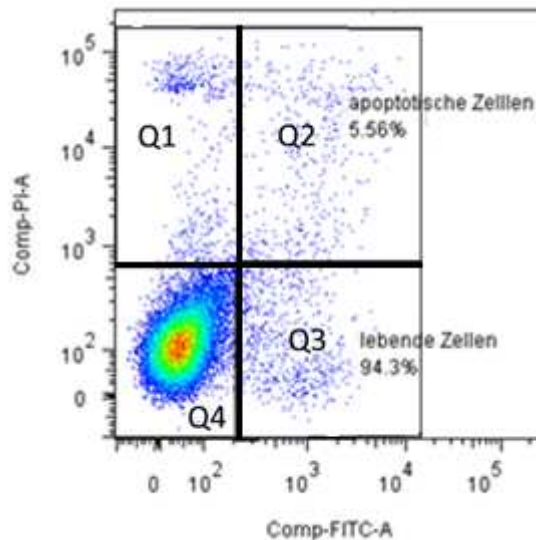
### 2.3.9 Der Annexin-V/ FITC –Apoptose-Assay

Zusätzlich zur Beurteilung der Zellfraktion, die in die G0-Phase übergegangen ist, konnte mithilfe des Annexin-V-FITC-Assays die Zellfraktion bestimmt werden, die durch die Antikörperbehandlung apoptotisch wurden. Bei Annexin-V handelt es sich dabei um ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein, das mit hoher Affinität an das Membranprotein Phosphatidylserin bindet. Während sich dieses Protein bei intakten, vitalen Zellen komplett an der Innenseite der Zellmembran befindet, wird es in der Frühphase der Apoptose an die Außenseite transloziert, wodurch Annexin binden kann (119). Durch Kopplung des Annexins mit dem Fluorochrom FITC konnten die markierten Zellen im Durchflusszytometer detektiert werden. Als zweiter Farbstoff kam auch hier PI zum Einsatz, das bekannterweise bei fixierten permeabilisierten Zellen in die DNA interkaliert. Da es aber die Zellmembran von intakten Zellen nicht durchqueren kann, werden nur bereits tote, d.h. nekrotische oder spät apoptotische Zellen damit gefärbt.

Nach erneutem Herausfiltern der Einzelzellen durch Gating im FSC/ SSC-Dot-Blot wurde nun die PI- gegen die Annexin-V-FITC-Fluoreszenz aufgetragen. Hier konnte der Anteil von intakten, d.h. sowohl Annexin-V-FITC- als auch PI-negativen Zellen (Q4, im Diagramm links unten) sowie von abgetöteten Zellen, sei es nekrotisch (Q1: PI positiv, Annexin-V-FITC negativ) oder apoptotisch (früh: Q3: Annexin-V-FITC positiv, PI negativ; spät: Q2: PI und Annexin-V-FITC positiv), bestimmt werden (siehe Abbildung 18).



a)



b)

Abb. 18:

a) Schema zum Prinzip des Annexin-V/ FITC–Apoptose-Assays (135)

Links: Bei lebenden Zellen befindet sich Phosphatidylserin komplett an der Membraninnenseite. Demnach kann Annexin-V und somit auch FITC nicht binden.

Mitte: In der frühen Apoptose wandert Phosphatidylserin zum Teil an die Membranaußenseite (136). Daran kann Annexin-V nun binden und FITC weist diese Bindung nach.

Rechts: Erst in der späten Phase der Apoptose und in der Nekrose öffnet sich die Zellmembran und ermöglicht es so dem Farbstoff PI, ins Zellinnere und dann in den Zellkern einzudringen und dort mit der DNA zu interkalieren.

b) Originalbild zur Veranschaulichung der Auswertung der Annexin-V/ FITC–Apoptose-Assays.

Aufgetragen ist hier das PI- gegen das FITC-Signal. FITC wiederum bindet an Annexin-V, das in der Frühphase der Apoptose an die Membranaußenseite wandert. Im Quadranten Q4 finden sich die vitalen, intakten Zellen, die sowohl ein niedriges FITC- als auch PI-Signal zeigen. Die Quadranten Q1 bis Q3 wurden in der späteren Auswertung zu „apoptotischen Zellen“ zusammengefasst und nicht näher zwischen früh apoptotischen (Q3), spät apoptotischen (Q2) und nekrotischen Zellen (Q1) unterschieden.

## 2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte bei allen Versuchen mit Microsoft Excel 2007. Aus mehreren Versuchsreihen wurden Mittelwerte sowie Standardabweichungen ermittelt und diese anschließend in Balkendiagrammen dargestellt (siehe Teil Ergebnisse).

Aus Vergleichen der einzelnen Behandlungen mit ihren jeweiligen Kontrollen konnten dann mithilfe des Student'schen t-Tests Signifikanzen auf einem Signifikanzniveau von 5 % berechnet werden.

## 2.5. MATERIALIEN

### 2.5.1. Medien und Zusätze für die Zellkultur

RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*)  
 DMSO (*Dimethylsulfoxid*)  
 Einfriermedium  
 FKS (*Fötales Kälberserum*)  
 PBS (*phosphat buffered saline*)  
 Trypsin mit EDTA

PAN Biotech GmbH, Aidenbach  
 Merck, Darmstadt  
 RPMI mit 10% FKS und 10% DMSO  
 PAN Biotech GmbH, Aidenbach  
 Biochrom AG, Berlin  
 PAN Biotech GmbH, Aidenbach

### 2.5.2. Antikörper

#### Primärantikörper

Trastuzumab (Herceptin™)  
 Pertuzumab (Omnitarg™)  
 Lapatinib  
 Tamoxifen

Genentech, South San Francisco, CA, USA  
 Genentech, South San Francisco, CA, USA  
 Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA  
 Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

*rabbit anti-human* HER2/ErbB2 (29D8) #2165,  
 polyklonal

Cell Signaling Technology, Inc., Beverly,  
 MA, USA

*rabbit anti-human* Phospho-HER2/ErbB2 (Tyr877)  
 # 2241, polyklonal

Cell Signaling Technology, Inc., Beverly,  
 MA, USA

*rabbit anti-human* Phospho-HER2/ErbB2 (Tyr1248),  
 #2247, polyklonal

Cell Signaling Technology, Inc., Beverly,  
 MA, USA

*rabbit anti-human* HER4/ErbB4(111B2) #4795,  
 monoklonal

Cell Signaling Technology, Inc., Beverly,  
 MA, USA

*rabbit anti-human* Phospho-HER4/ErbB4 (Tyr1284),  
 #4757, monoklonal

Cell Signaling Technology, Inc., Beverly,  
 MA, USA

*rabbit anti-human*  $\beta$ -Actin #A2066,  
 polyklonal

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
 Deisenhofen

*mouse anti-estrogen-receptor* #NCL-L-ER-6F11 *novo Castra*,  
 monoklonal

Leica Microsystems, Wetzlar

#### Sekundärantikörper

*goat anti-rabbit* HRP-konjugierter Antikörper #7074,  
 polyklonal

Cell Signaling Technology, Inc., Beverly,  
 MA, USA

### 2.5.3. DNA-Farbstoffe, Basenanaloga, Enzyme und Wachstumsfaktoren

#### DNA-Farbstoffe; Basenanaloga

Propidiumiodid

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
 Deisenhofen

Hoechst 33258	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
BrdU/ DC	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Annexin-V-FITC	ImmunoTools, Friesoythe
FITC	ImmunoTools, Friesoythe

#### Enzyme

RNAse	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
-------	-----------------------------------

#### Wachstumsfaktoren

$\beta$ -Estradiol	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
--------------------	-----------------------------------

#### Molekulargewichtstandard

Molekulargewichtsstandard	Biorad Laboratories GmbH, München
---------------------------	-----------------------------------

### 2.5.4. Gebrauchsfertig zusammengestellte Reagenzien (Kits)

BCA-Protein-Assay-Kit	Pierce, Niederlande/ ThermoScientific
ECL-plus Western-Blotting <i>Detection System</i>	Amersham Biosciences, England
EnVision + Dual Link System Peroxidase	Dako Cytomation, Hamburg

### 2.5.5. Reagenzien und Chemikalien

$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
$\epsilon$ -Amino-Capronsäure	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen
Acrylamid-Stammlösung (40%)	Roth, Karlsruhe
APS	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Biotest AG, Dreieich
EDTA	Serva, Heidelberg
Ethanol	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen
Formaldehyd	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
HEPES	
IGEPAL	
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
PMSF	AppliChem, Darmstadt
<i>Precision Protein Standard</i>	Biorad Laboratories GmbH, München
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Merck, Darmstadt
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

Proteaseinhibitor Cocktail 10x	Deisenhofen Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Tris	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Zelllysepuffer	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA
<b>2.5.6. Puffer und Lösungen</b>	
DNA-Puffer	100mM Tris-HCl (pH 7,4) 0,9% NaCl 1 mM CaCl <sub>2</sub> 0,5mM MgCl <sub>2</sub>
DNA-Waschpuffer	DNA-Puffer + 0,2 % BSA
DNA-Permeabilisierungspuffer	DNA-Waschpuffer + 0,1 % IGEPAL
DNA-Färbepuffer	pro Probe: 477,0 µl DNA-Permeabilisierungspuffer 20,0 µl RNase A 2,4 µl Hoechst 33258
PBS ( <i>phosphat buffered saline</i> )	137mM NaCl 6,5mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,7mM KCl
TE-Puffer	25mM Tris-HCl (pH 7,6) 1 mM EDTA
Annexin-Bindungspuffer 10x	0,1 M HEPES 1,4 M NaCl 25mM CaCl <sub>2</sub>
<u>Zusammensetzung des Polyacrylamidgels:</u>	
Sammelgel (4%-ig)	3,05ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> 1,25ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 50 µl SDS (10 %) 650 µl Acrylamid-Stammlösung (40 %) 25 µl APS (10 %) 5 µl TEMED
Trenngel (7,5%-ig)	5,465 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 10 µl SDS (10 %) 1,875 ml Acrylamid-Stammlösung (40 %) 50 µl APS (10 %) 10 µl TEMED



Laufpuffer 5x	20 mM Tris-HCl (pH 8,3) 195 mM Glycin 1 % SDS
SDS-Probenpuffer 2x	20% Glycerin 1,25M Tris-HCl (pH 6,8) 4 % SDS 0,02% Bromphenolblau 10% $\beta$ -Mercaptoethanol
Anodenpuffer 1	300 mM Tris-HCl (pH 10,4) 20% Methanol
Anodenpuffer 2	25 mM Tris-HCl (pH 10,4) 20% Methanol
Kathodenpuffer	40 mM $\epsilon$ -Amino-n-Capronsäure (pH 7,6) 20% Methanol
AP-Puffer 10x	1M Tris-HCl (pH 7,4) 1M NaCl 25 mM MgCl <sub>2</sub>
AP-T-Puffer	0,1% Tween 20 in AP-Puffer 1x
PMSF-Stammlösung	100 mM in Isopropanol (-20°C)
Zelllysepuffer	20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA 1 mM EGTA 1 % Triton-X 100 2,5 mM Natriumpyrophosphat 1 mM $\beta$ -Glycerophosphat 1 mM Natriumvanadat 1 $\mu$ g/ml Leupeptin 1 mM PMSF (Zugabe kurz vor Gebrauch) 1:10 verd. Proteaseinhibitor 10x(Zugabe kurz vor Gebrauch)

### 2.5.7. Verbrauchsmaterial

Deckgläser	Engelbrecht GmbH, Edermünde
Gewebe-Kulturflaschen T25 (100 ml)	Greiner, Solingen
Gewebe-Kulturflaschen T175 (600 ml)	Greiner, Solingen
Hyperfilm	Amersham Pharmacia Biotech, England
Kryoröhrchen	Greiner, Solingen
Mikrotiterplatten	Falcon, Heidelberg
Neubauer-Zählkammer	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & CoKG, Braunschweig
Polystyrol Rundbodenröhrchen 5 ml	Falcon, Heidelberg
PVDF-Membran	Roche Diagnostics, Mannheim
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Trägerflüssigkeit FACSFlow	BD Biosciences, Heidelberg
Universalindikator pH 0-14	Merck, Darmstadt
Zellschaber	Greiner, Solingen
Zellsiebe - <i>Cellstrainer</i>	Falcon, Heidelberg

Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)

Greiner, Solingen

### 2.5.8. Geräte

Biorad 200/2,0 *Constant Voltage*  
Durchflussszytometer FACSCanto II  
ELISA-Reader  
Eppendorf-Pipetten  
Inkubator Heraeus 6000  
Labovort FS  
Mikroskop AxioVert 200  
MilliQWater System  
Mini Protean 3 Elektrophorese-Einheit  
pH-Meter WTW pH522

Sterilbank LaminAir HBB 2472 S  
Unimax 1010

Vortex REAX 2000  
Waage Sartorius R16OP  
Wasserbad GFL 1083

Western-Blot Kammer  
Whatman Filterpapier

#### Zentrifugen:

Tischzentrifuge *Centrifuge* 5415  
Tischzentrifuge Biofuge pico  
Megafuge 1.0 R  
Varifuge 3.2RS  
Rotina 380 R

Biorad Laboratories GmbH, München  
BD Biosciences, Heidelberg  
MWG Biotech, Ebersberg  
Eppendorf-Netheler-Hiz GmbH, Hamburg  
Heraeus Sepatech, Osterode  
Leitz Messtechnik GmbH, Wetzlar  
Carl Zeiss AG, Jena  
Millipore S. A., Molsheim, Frankreich  
Biorad Laboratories GmbH, München  
Wissenschaftlich-Technische Werkstätten  
GmbH & Co, Weilheim  
Heraeus Sepatech, Osterode  
Heidolph Instruments GmbH & Co. KG,  
Schwabach  
Heidolph Instruments, Schwabach  
Sartorius, Göttingen  
Gesellschaft für Labortechnik mbH,  
Burgwedel  
Biometra, Göttingen  
Laborcenter, Nürnberg

Eppendorf, Hamburg  
Heraeus Sepatech, Osterode  
Heraeus Sepatech, Osterode  
Heraeus Sepatech, Osterode  
Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. SDS-PAGE und Western Blot-Untersuchungen zum Nachweis der erfolgreichen Downregulation des ErbB4-Rezeptors und ER $\alpha$ in ZR-75-1-Zellen

In den vorliegenden Versuchen wurden „ZR-75-1- Wildtypzellen“ mit ZR-75-1-Zellen nach Downregulation des ErbB4- bzw. des Estrogenrezeptors alpha (ER $\alpha$ ) verglichen. Um diesen Knockdown der Rezeptoren, der über siRNA-Transfektion erreicht wurde (siehe 2.1.2.), nachzuweisen, wurden bei jedem Versuchsansatz je eine Dharmafect-Kontrolle und eine mit siRNA transfizierte Probe zusätzlich mitgeführt und anschließend lysiert. Die lysierten Proteine konnten dann durch Western-Blotting sichtbar gemacht werden. Bereits ohne quantitative Auswertung zeigten die Banden in Höhe des jeweiligen Rezeptors eine deutlich abgeschwächte bis aufgehobene Schwärzung in den siRNA- und somit Knockdown-Proben im Vergleich zu den Kontrollen. Dies entspricht dem erwünschten Ergebnis des erfolgten Knockdowns. Die quantitative Auswertung und somit Festigung dieser Feststellung erfolgte dann mithilfe des Programms *ImageQuant*, welches die absoluten Schwärzungsvolumina jeder einzelnen Bande densitometrisch berechnete. Das Volumen der Rezeptor-Bande wurde je mit dem Volumen der dazugehörigen  $\beta$ -Aktin-Bande verrechnet, welche als Laufkontrolle diente. Wurde dieser Quotient für die siRNA-behandelte Probe wiederum mit dem entsprechenden Quotienten der Dharmafect-Kontrollprobe in Verhältnis gesetzt, ergab sich hieraus das prozentuale Ausmaß der Rezeptor-Downregulation.

So ergab sich für den ErbB4-Rezeptor nach Zusammenfassung aller acht Einzelversuche ein durchschnittlicher Knockdown des Rezeptors von 63 % bzw. wurden anders ausgedrückt nur noch 37 % des Rezeptors im Vergleich zur Kontrolle exprimiert (siehe Abbildung 19).

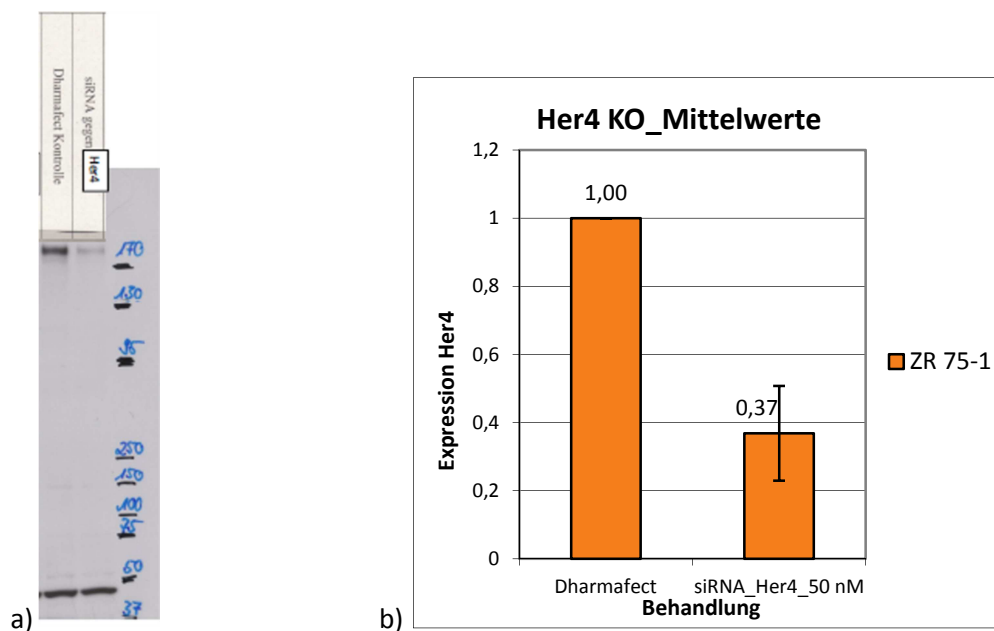


Abb. 19:

a) Western-Blot aus Zelllysaten der Mammakarzinomzelllinie ZR-75-1. Zur Darstellung kommt die Expression des ErbB4-Rezeptors (Bande bei 180 kDa) vor (links) und nach Knockdown des Rezeptors mittels siRNA. Als Laufkontrolle diente  $\beta$ -Aktin, welches sich in den unteren Banden bei 42 kDa zeigt.

b) Densitometrische Auswertung von sechs Western-Blot-Untersuchungen zur Ermittlung des siRNA-induzierten Knockdowns des ErbB4-Rezeptors in ZR-75-1-Zellen. Dabei wurde die Expression des ErbB4-Rezeptors auf die Dharmafect-Kontrollprobe normiert (= 1,00). Es wurden 6 voneinander unabhängige Experimente mit 12 unterschiedlichen Proteinlysaten (6 x Dharmafect, 6 x siRNA) durchgeführt und ausgewertet.

Entsprechend wurde für den ER $\alpha$  und dessen Knockdown verfahren und es ergab sich ein 72 %-iger Knockdown des Rezeptors. Die Abbildung 20 veranschaulicht dies graphisch, indem hier die Expression des Rezeptors auf der y-Achse gegen die Behandlung der Proben auf der x-Achse aufgetragen wurde. Der prozentuale Knockdown ergibt sich durch Subtraktion des dargestellten Werts der Expression unter Knockdown-Bedingungen von 1,0.

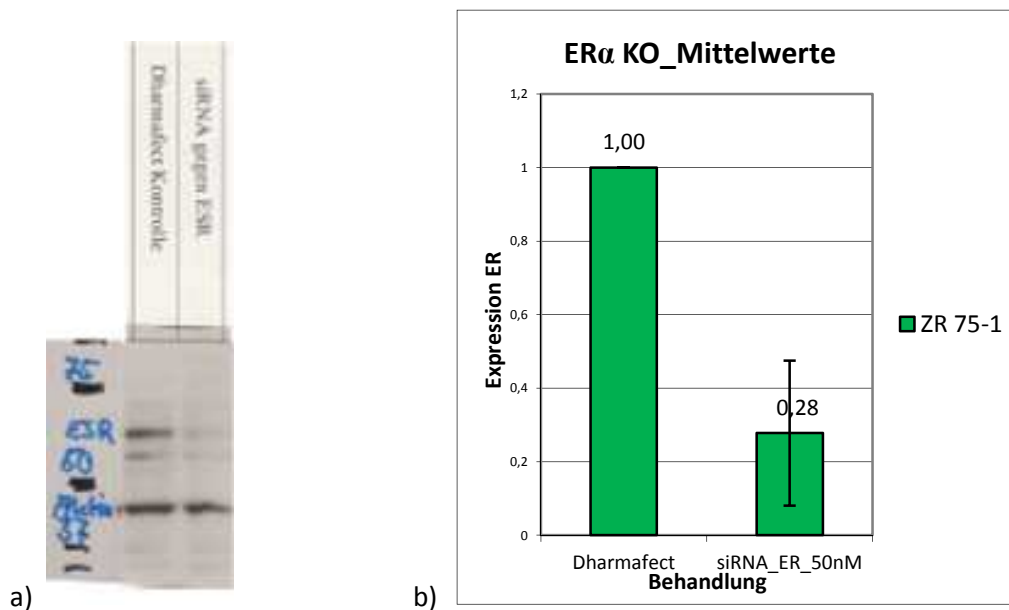


Abb. 20:

a) Western-Blot aus Zelllysaten der Mammakarzinomzelllinie ZR-75-1. Zur Darstellung kommt die Expression des Estrogenezeptors alpha ER $\alpha$  (Bande bei 67 kDa) vor (links) und nach Knockdown des Rezeptors mittels siRNA. Als Laufkontrolle diente  $\beta$ -Aktin, welches sich in den unteren Banden bei 42 kDa zeigt.

b) Densitometrische Auswertung von drei Western-Blot-Untersuchungen zur Ermittlung des siRNA-induzierten Knockdowns des ER $\alpha$  in ZR-75-1-Zellen. Dabei wurde die Expression des ER $\alpha$  auf die Dharmafect-Kontrollprobe normiert (links = 1,00). Es wurden 6 voneinander unabhängige Experimente mit 6 unterschiedlichen Proteinlysaten (3 x Dharmafect, 6 x siRNA) durchgeführt und ausgewertet.

### 3.2. SDS-PAGE und Western-Blot-Untersuchungen zum Ausschluss von „off target“-Effekten durch die siRNA-Zugabe

Darüber hinaus konnte in weiteren Western-Blots (Abb. 21) gezeigt werden, dass durch die siRNA-Behandlung der Zellen gegen den ErbB4-Rezeptor die anderen Rezeptoren der ErbB-Familie nicht beeinflusst wurden und somit keine sogenannten „off-target-Effekte“ vorlagen. Dazu wurden wiederum Lysate von ErbB4-Knockdown-Zellen und Dharmafect-Kontrollzellen hergestellt, jedoch hierbei beim Blotting zusätzlich Antikörper gegen die anderen ErbB-Rezeptoren und ihre Phosphorylierungsstellen verwendet.

Während hierbei erneut der erfolgreiche Knockdown des ErbB4-Rezeptors gezeigt werden konnte (siehe Abb. 20 C, Downregulation 72 %), konnte weder für den ErbB1 (Expression 1,28 im Vergleich zu 1), noch für ErbB2 (Expression 0,95 im Vergleich zu 1), noch für ErbB3 (Expression

1,06 im Vergleich zu 1) ein Knockdown nachgewiesen werden. Auch die Aktivität der Phosphorylierungsstellen der genannten Rezeptoren blieb unverändert durch siRNA-Zugabe gegen ErbB4.

Das in Abb. 21 B erkennbare Phänomen der Hochregulierung der ErbB2-Phosphorylierungsstelle nach Trastuzumabzugabe ist aus früheren Versuchen bekannt und in gleichem Maße bei Dharmafect-Kontrollen und siRNA-behandelten Zellen zu beobachten.

Aufgrund dieser Beobachtungen konnte in den weiterführenden Versuchen vorausgesetzt werden, dass die beobachteten Effekte alleine durch den Verlust des ErbB4- und keinen der anderen Rezeptoren dieser Familie zurückzuführen sind. Dies ließ eindeutige Schlussfolgerungen zu, ob und inwiefern sich die Anwesenheit der entsprechenden Rezeptoren (ErbB4 und ER $\alpha$ ) auf das Ansprechen gegenüber ErbB2- und ER-Targeting auswirkt.

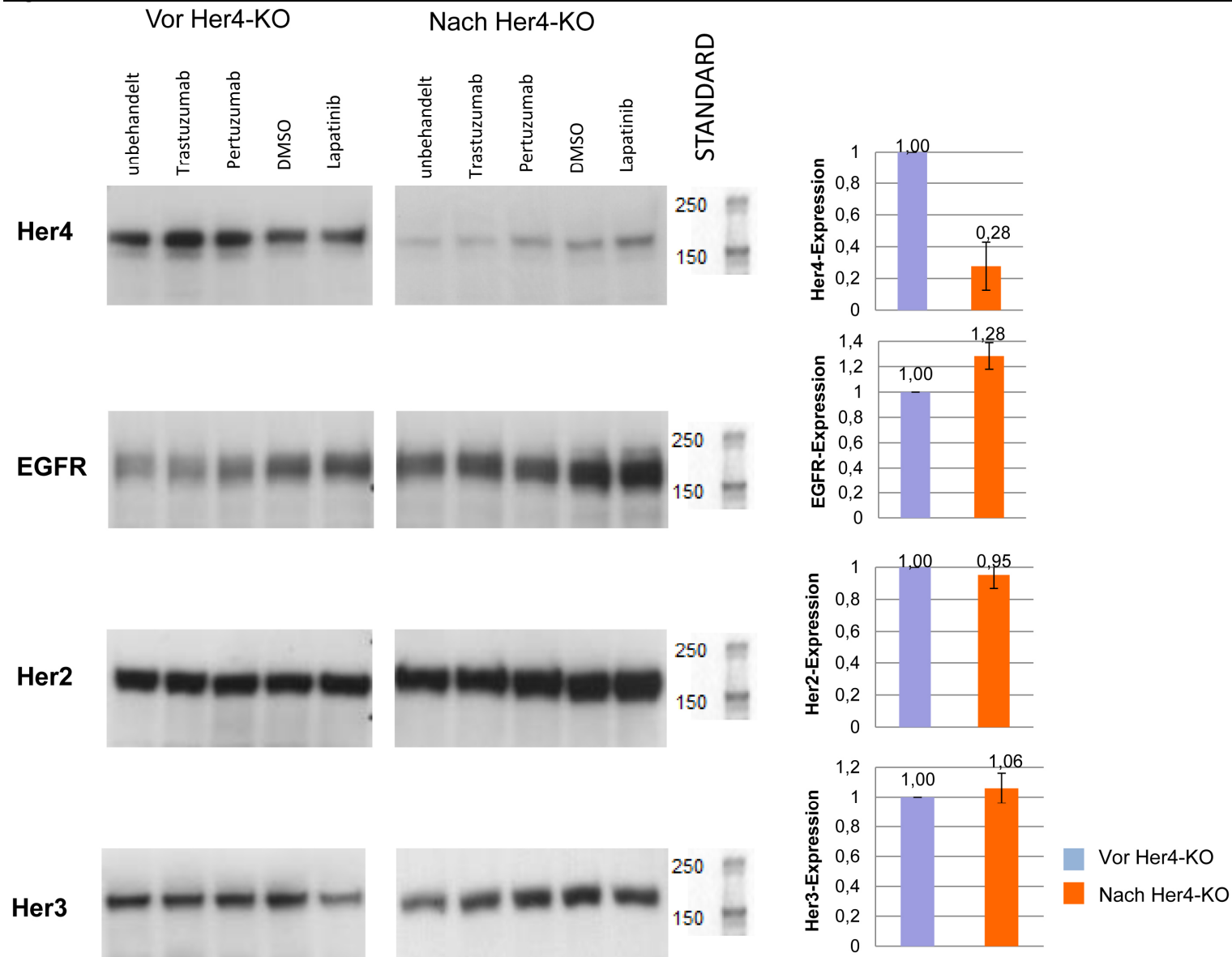


Abb. 21a:

Western Blots aus Zelllysaten der Mammakarzinomzelllinie ZR-75-1.

Links: Dargestellt ist die Expression der verschiedenen Vertreter der ErbB-Rezeptorfamilie (von oben nach unten: ErbB4, EGFR, ErbB2, ErbB3) vor (links) und nach (rechts) Knockdown des ErbB4-Rezeptors mittels siRNA.

Rechts: Densitometrische Auswertung der gezeigten Western-Blots. Die Expression des jeweiligen Rezeptors wurde auf die Kontrolle ohne siRNA (jeweils links: 1,00) normiert

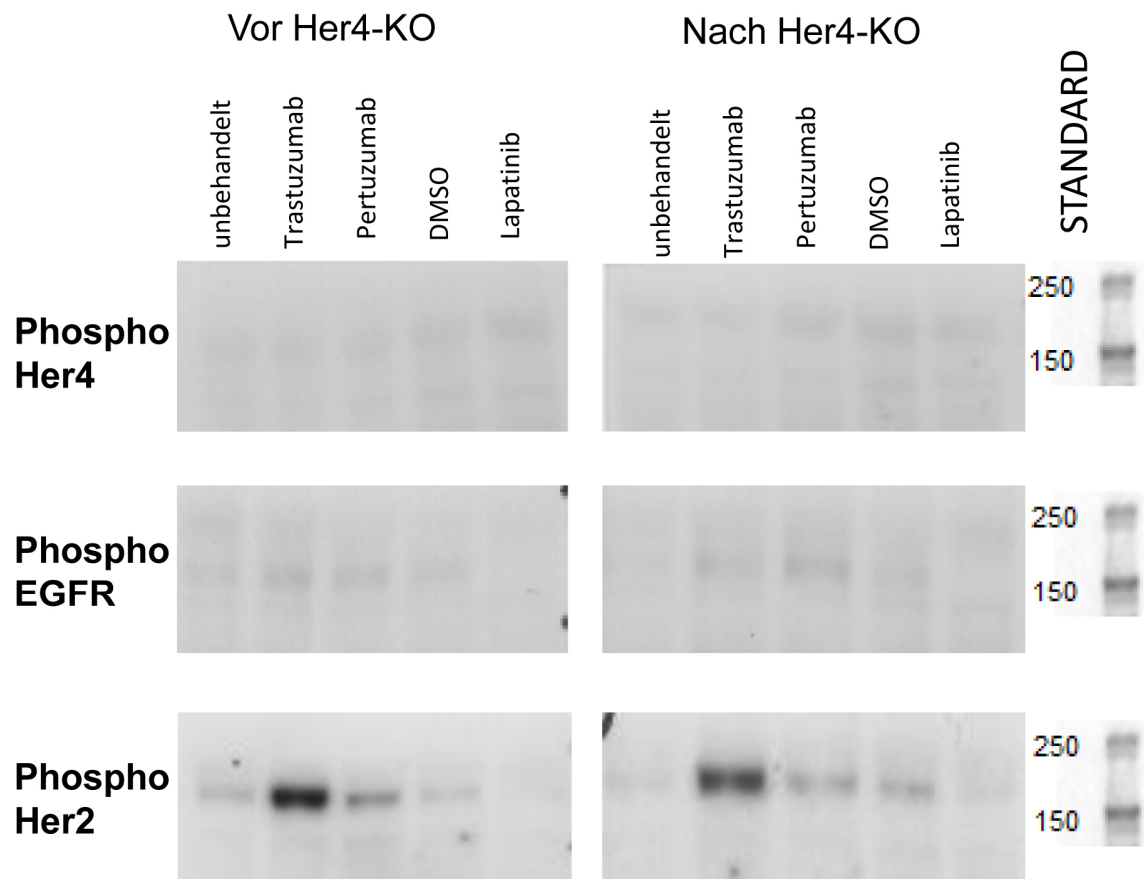


Abb. 21b: Western Blots aus Zelllysaten der Mammakarzinomzelllinie ZR-75-1. Dargestellt ist die Aktivität der Phosphorylierungsstellen der verschiedenen Vertreter der ErbB-Rezeptorfamilie (von oben nach unten: ErbB4, EGFR, ErbB2) vor (links) und nach (rechts) Knockdown des ErbB4-Rezeptors mittels siRNA.

Anmerkung: Für die Phosphorylierungsstellen des ErbB3-Rezeptors lagen zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung keine Antikörper vor.

### 3.3. Zellzyklusanalysen: BrdU/Hoechst-Quenching-Messungen

Einer der entscheidenden Effekte, die man sich von bisher zugelassenen Therapeutika gegen Hormon (Tamoxifen)- bzw. ErbB2-Rezeptoren (Trastuzumab, Pertuzumab, Lapatinib) in der Therapie des Mammakarzinoms erhofft, ist die Verlangsamung bzw. Beendigung der Proliferation von rezeptorpositiven Krebszellen.

Der Einfluss der verschiedenen ErbB2-Targets (Trastuzumab, Pertuzumab, Lapatinib) sowie des Estrogen-Antagonisten Tamoxifen auf die Zellproliferation der ZR-75-1 wurde in diesen Versuchsreihen mithilfe der unter 2.3.8. beschriebenen BrdU/Hoechst-Quenching-Technik untersucht. Dabei konnte mittels Durchflusszytometrie die G0-Fraktion im Bezug auf die restlichen Zellzyklen ermittelt werden. Diese gibt eine Auskunft über die ruhenden im Vergleich zu den proliferierenden Zellen und lässt dadurch eine Aussage über das Ansprechen auf die Behandlung zu. Als Kontrollen wurden bei allen drei Versuchsreihen (Wildtyp, ErbB4-Downregulation, ER-Downregulation) eine unbehandelte Probe, eine Probe mit dem Transfektionsreagenz Dharmafect und eine Probe mit DMSO mitgeführt. Die letztgenannte DMSO-Kontrolle diente als Kontrolle für die Lapatinib-Behandlung, da dieser niedermolekulare TKI in DMSO gelöst war. In den Downregulations-Versuchen wurde eine zusätzliche Kontrollprobe lediglich mit siRNA behandelt, um eine Änderung der G0-Fraktion durch Rezeptor-

Downregulation aufzuzeigen bzw. auszuschließen. Diese wird im Folgenden als „siRNA\_unbehandelt“ bezeichnet. Die durchflusszytometrische G0-Analyse erfolgte 120 Stunden nach der ersten Antikörperbehandlung bzw. 96 Stunden nach der ersten Zugabe von BrdU und DC (siehe Zellkulturprotokoll unter 2.1.2).

Für jede Versuchsreihe wurden mindestens drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

### 3.3.1. BrdU/DC-Konzentrations-Versuche

Für den gewünschten „Quenching-Effekt“ sorgt letztendlich die Zugabe der beiden Nukleosidanaloga BrdU (Bromdesoxyuridin) und DC (Desoxycytidin) (vergleiche 2.3.8). Da diesen selbst auch geringe antiproliferative Effekte zugeschrieben werden (64), sollten deren Konzentrationen möglichst niedrig gehalten werden, ohne ihren Effekt in der Durchflusszytometrie zu verlieren.

Daher wurden in einem Vorversuch vier verschiedene Konzentrationen (BrdU/ DC: 120µM/ 60µM, 60µM/ 30µM, 5µM/ 2,5µM, 3,5µM/ 1,75µM) sowie zwei verschiedene Zeitpunkte (Ernte nach 48 h und nach 96 h) durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurden sowohl Quenching-Messungen durchgeführt, um den gewünschten Effekt nachzuweisen, als auch statische DNA-Messungen mit Bestimmung der S-Phase-Fraktion, um eine Aussage über die Beeinträchtigung der Proliferation durch Zugabe der Reagenzien zu bekommen.

Wie die Quenching-Bilder in der Abb. 22 deutlich machen, stellte sich nur bei der höchsten Konzentration (BrdU 120µM/ DC 60µM) nach 96 Stunden ein ausreichender Quenching-Effekt ein, bei dem die Zellen den einzelnen Zellzyklen eindeutig zugeteilt werden konnten. Dafür müssen jedoch Abstriche in der S-Phase und somit in der Proliferation der Zellen in Kauf genommen werden. Im Vergleich zu 13,9 % bei unbehandelten Zellen befinden sich bei den genannten Konzentrationen noch 4,53 % in der S-Phase. Aufgrund dieser Feststellungen wurde in sämtlichen Versuchen BrdU in einer Konzentration von 120 µM und DC in einer Konzentration von 60 µM eingesetzt und die Zellen dieser Behandlung 96 Stunden ausgesetzt, ehe sie für Quenching-Messungen geerntet wurden.



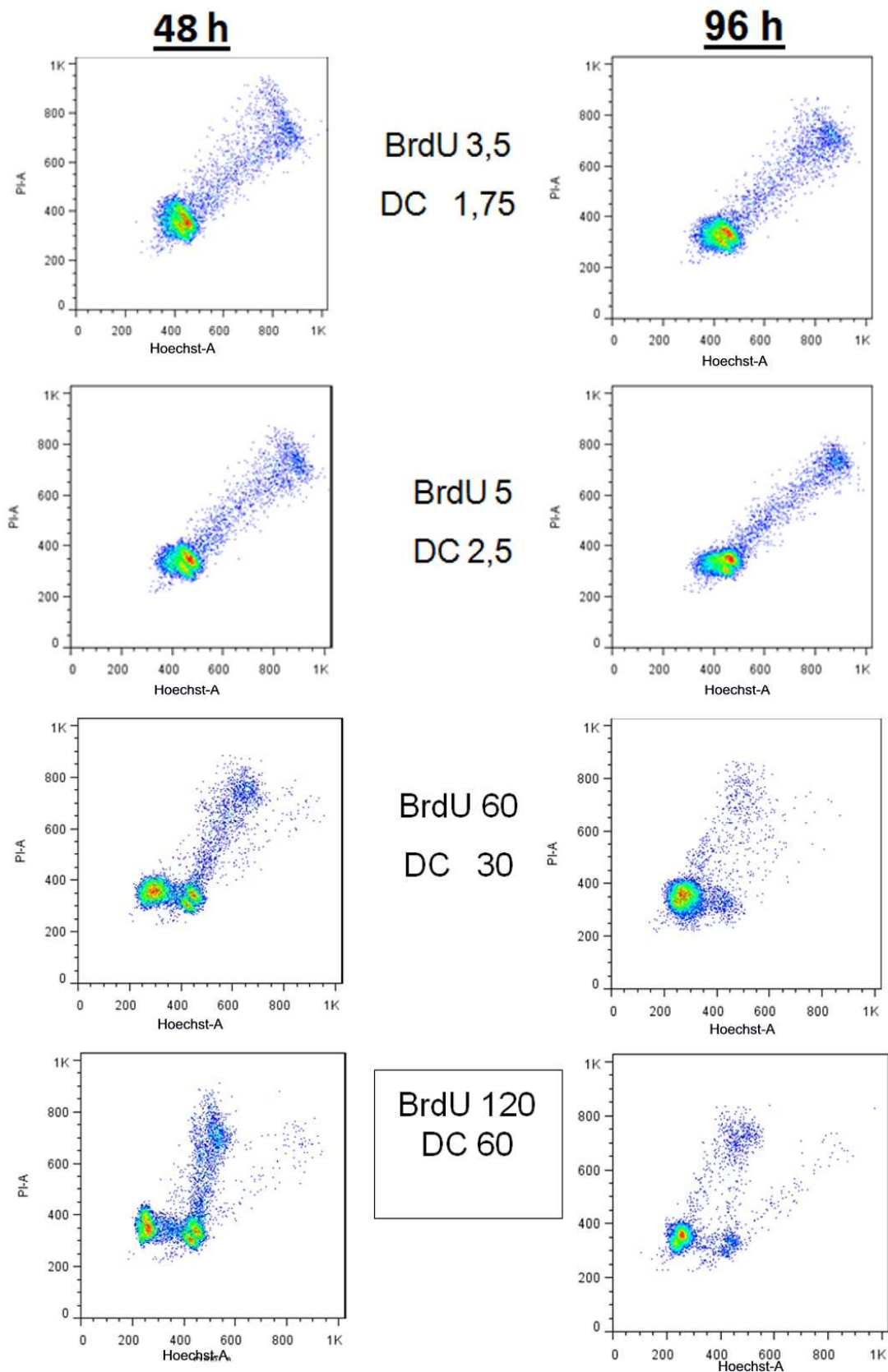


Abb. 22: FACS-Bilder zu Quenchingmessungen der BrdU/DC-Konzentrationsversuche. Hierbei ist das Hoechst- gegen das PI-Signal bereits nach Ausschluss von Dubletten und Zelldebris aufgetragen. Während links und rechts zwei Verschiedene Zeitpunkte (48 h, 96 h) unterschieden werden, sind von oben nach unten die unterschiedlichen Konzentrationen von BrdU und DC in aufsteigender Reihenfolge (von oben nach unten: BrdU/ DC: 120 $\mu$ M/ 60 $\mu$ M, 60 $\mu$ M/ 30 $\mu$ M, 5 $\mu$ M/ 2,5 $\mu$ M, 3,5 $\mu$ M/ 1,75 $\mu$ M) dargestellt.

### 3.3.2. Inhibition der Zellproliferation bei untransfizierten „Wildtyp-ZR-75-1“

Bei den „Wildtyp-ZR-75-1“ (vgl. Abb. 23 blaue Balken) ergibt sich bei der unbehandelten Kontrolle eine G0-Fraktion von 3,47 %, die sich durch Zugabe von Dharmafect nur unwesentlich auf 4,09 % erhöht. Der Mittelwert der G0-Fraktion der DMSO-Kontrollproben liegt mit 3,73 % sogar unter dem der Dharmafect-Kontrollen. Auch eine Behandlung mit den monoklonalen Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab führt mit G0-Fraktionen von 4,42 % (Trastuzumab) bzw. 3,75 % (Pertuzumab) zu keinem zusätzlichen G0-Exit der Zellen. Die Zugabe von Lapatinib jedoch erhöht die G0-Fraktion von 3,73 % (DMSO) auf 6,55 %, was einer 75-prozentigen und auch leicht signifikanten Steigerung entspricht ( $p=0,035$ ). Noch eindrücklicher ist der Effekt bei Tamoxifen, dem Estrogenrezeptor-Antagonist. Dessen Zugabe hat eine über 300-prozentige G0-Steigerung von 4,09 % auf 17,74 % zur Folge. Bei den letzten beiden Proben wurde das normale FKS durch Aktivkohle filtrierte FKS ersetzt. Dass den Proben dadurch wichtige Hormone und Wachstumsfaktoren fehlten, spiegelt sich auch deutlich im Anstieg der G0 Fraktion von 4,09 % auf 11,77 % (Aktivkohle) wider. Wurde dann mit  $\beta$ -Estradiol den Zellen ein wesentlicher Wachstumsfaktor wieder hinzugefügt, gehen auch nicht mehr so viele in die G0-Phase über (Aktivkohle +  $\beta$ -Estradiol: 9,77 %). Dennoch besteht auch bei dieser Probe eine signifikante G0-Zunahme.

### 3.3.3. Inhibition der Zellproliferation von ZR-75-1 in Abhängigkeit des ErbB4-Knockdowns

Bei der Zellzyklusanalyse der Versuchsreihe „ErbB4-Downregulation“ (Abb. 23 orangene Balken) macht die G0-Fraktion der unbehandelten Kontrollprobe 4,94 % aus. Durch alleinige Zugabe von Dharmafect steigt die G0-Fraktion leicht auf 7,05 % an. Wird dann zusätzlich dazu siRNA in der Konzentration von 50 nM zugegeben, führt dieser Verlust des ErbB4 zu keinem weiteren Anstieg des G0-Anteils, dieser liegt sogar niedriger (siRNA\_unbehandelt: 6,65 %). Wie auch schon bei den Wildtypversuchen zeigt eine Behandlung mit Trastuzumab und Pertuzumab auch hier keine besondere Wirkung. Trastuzumab erhöht die G0-Fraktion von 6,65 % auf 7,15 %, bei Pertuzumab fällt die Steigerung mit 6,82 % G0-Zellen noch geringer aus. Die Zugabe von DMSO beeinflusst die Brustkrebszellen eher positiv, die G0-Fraktion liegt hier bei 5,20 %. Umso deutlicher wird die Wirkung von Lapatinib, dessen Zugabe die G0-Fraktion von diesem Kontrollwert (DMSO: 5,20 %) auf 18,02 % anhebt. Dies bedeutet eine Steigerung von mehr als 300 % und ein höchst signifikantes Ergebnis ( $p < 0,001$ ). Auch Tamoxifen zeigt erneut einen eindrücklichen Effekt mit einer durchschnittlichen G0-Anteil von 45,19 % ( $p < 0,0001$ ). Auch bei den „Aktivkohle-Proben“ entspricht das Ergebnis dem der Wildtypversuche. Die Zellen reagieren auf den Entzug der Wachstumsfaktoren mit deutlichem G0-Exit (Aktivkohle: 17,01 %), der durch  $\beta$ -Estradiol-Zugabe wieder etwas rückgängig gemacht werden kann (Aktivkohle + Estradiol: 13,8 %).

### 3.3.4. Inhibition der Zellproliferation von ZR-75-1 in Abhängigkeit des ER $\alpha$ -Knockdowns

Die unbehandelten Zellen der Mammakarzinomzelllinie ZR-75-1 in der „ER-Downregulations-Versuchsreihe“ (Abb. 23 grüne Balken) weisen eine G0-Fraktion von 5,17 % auf. Unter Dharmafect-Zugabe steigt dieser Wert erneut an, jedoch nicht signifikant auf 6,78 %. Im Gegensatz zu den „ErbB4-Downregulationsversuchen“ steigt jedoch die G0-Fraktion bei einem Knockdown des Estrogenrezeptors deutlich und hoch signifikant von den angeführten 6,78 % auf

12,75 % an ( $p = 0,0011$ ). Von diesem Wert ausgehend, zeigt eine Zugabe von Trastuzumab (13,27 %) und Pertuzumab (14,49 %) auch hier keine großen Effekte auf die Proliferation. Davon unterscheidet sich erneut Lapatinib, welches im Vergleich zur DMSO-Kontrolle mit einer G0-Fraktion von 11,56 % durchschnittlich 25,71 % der Zellen in die G0-Phase überführt. Dies entspricht einer mehr als 120%-igen Steigerung und einem p-Wert von 0,0013 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Ein ER-Targeting mit Tamoxifen erübrigte sich hier aufgrund des fehlenden Rezeptors.

### 3.3.5. Zusammenfassende Betrachtung der Zellproliferationsmessungen

Die Abbildung 23 zeigt eine Zusammenschau der Zellproliferationsmessungen aller drei Versuchsreihen. Es sind die jeweiligen Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen dargestellt. Zusätzlich werden statistisch signifikante Ergebnisse mit Sternchen markiert (\*, \*\*, \*\*\*). Die dazu gehörigen p-Werte wurden auf Basis des Student-T-Tests in Bezug auf die jeweilige Kontrolle berechnet. Trastuzumab, Pertuzumab und Tamoxifen beziehen sich dabei auf Dharmafect-(Wildtyp-Versuche) bzw. „siRNA\_unbehandelt“ (Downregulations-Versuche), während Lapatinib mit der DMSO-Kontrolle verglichen wird.

Aus dieser Graphik lassen sich einige wichtige Beobachtungen ablesen.

Zunächst liegen die korrigierten G0-Fraktionen der unbehandelten Probe bei allen drei Versuchsreihen vergleichbar niedrig um die 5 % und auch die Dharmafect-Zugabe führt bei keinem der Ansätze zu einer deutlichen Zunahme. Bei der siRNA-Zugabe zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen ErbB4- und Estrogenrezeptor. Während der Knockdown des erstgenannten ErbB4 absolut keinen zusätzlichen G0-Exit verursacht, steigt allein durch Zugabe von siRNA gegen den ER die Zahl der in G0 befindlichen Zellen um knapp 80 % (von 6,78 % auf 12,75 %). Dagegen zeigt die Zugabe sowohl von Trastuzumab als auch von Pertuzumab bei keiner der 3 Versuchsreihen einen Effekt auf die in G0 arretierten Zellen. Im Gegensatz dazu führt Lapatinib bereits im Wildtypversuch zu einem leicht signifikanten Anstieg dieser Zellen, der jedoch nach Knockdown des ErbB4-Rezeptors erneut um ein Vielfaches zunimmt.

Tamoxifen zeigt am eindrucklichsten von allen eingesetzten Therapeutika bereits einen deutlichen Effekt auf die Wildtypzellen. Doch auch hier, vergleichbar mit den Lapatinib-Behandlungen, führt ein Knockdown des ErbB4-Rezeptors zu einem weiteren G0-Exit der Zellen.

Die letzten beiden mit Aktivkohle filtriertem FKS gefütterten Proben zeigen eindeutig, dass die Zellen in ihrer Proliferation auf die zahlreichen in FKS enthaltenen Wachstumsfaktoren angewiesen sind, was sich in einem signifikanten Anstieg der G0-Zellen widerspiegelt. Eine alleinige Zugabe von  $\beta$ -Estradiol ist zwar in der Lage, diesen Effekt etwas abzumildern, jedoch keineswegs ihn rückgängig zu machen. Auch hier liegt der Anteil ruhender Zellen deutlich höher als bei den Kontrollproben.

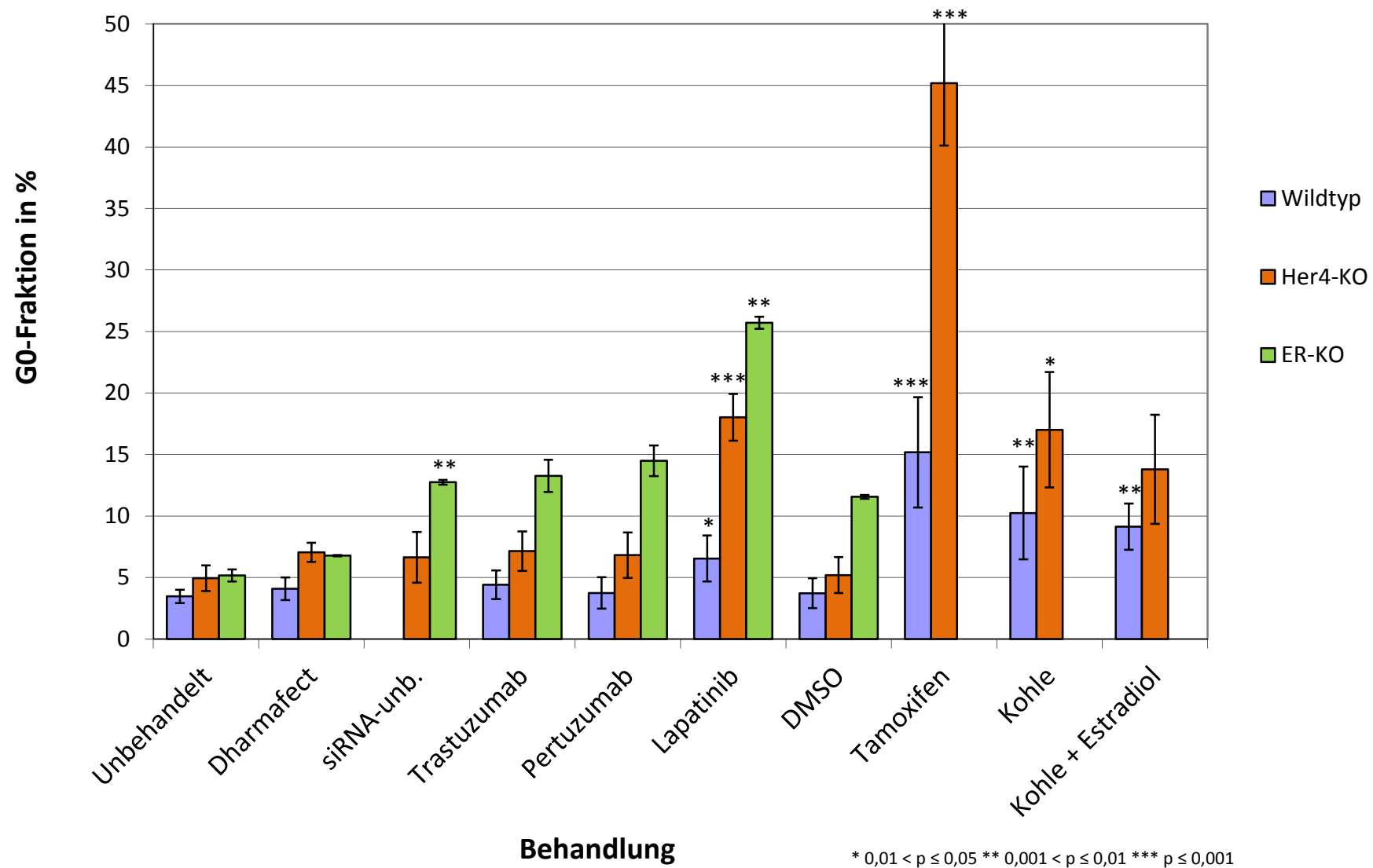


Abb. 23: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Zellproliferationsmessungen aller 3 Versuchsreihen (blau: Wildtyp, orange: ErbB4-Knockdown, grün: ER-Knockdown). Es ist der Anteil an Zellen in der G0-Phase gegen die jeweilige Behandlung aufgetragen. P-Werte sind als Sternchen dargestellt und beziehen sich auf die jeweilige Kontrolle. Kontrolle für siRNA-unb.: Dharmafect, für Lapatinib: DMSO, für Tamoxifen/ Kohle/ Kohle + Estradiol: siRNA-unb.

### 3.4. Annexin-V-FITC-Apoptose-Assays

Während in den BrdU/ Hoechst- Quenching-Messungen die G0-Fraktion ermittelt werden kann, wird in den Annexin-V-FITC-Apoptose-Assays der Anteil der Zellen bestimmt, die aufgrund der Behandlung in Apoptose gehen. Diese Induktion eines programmierten Zelltods stellt den zweiten entscheidenden Mechanismus dar, wie target-spezifische Therapien in die Proliferation von Tumorzellen eingreifen. Bei den hier beschriebenen Assays wurde erneut eine „Wildtyp-Versuchsreihe“ mit einer „ErbB4-Downregulations-Versuchsreihe“ verglichen. Eine „ER-Downregulation“ fand bei diesen Versuchen nicht statt. Darüber hinaus wurden lediglich die Proben gewählt, die schon bei den Quenching-Messungen Effekte aufzeigen konnten. Daher kamen als Kontrollen wiederum eine unbehandelte Probe, eine Dharmafect- und eine DMSO-Probe zum Einsatz. Eine Behandlung erfolgte mit Lapatinib und Tamoxifen in den zu den Quenching-Messungen entsprechenden Konzentrationen und entsprechender Dauer (120 Stunden). Ebenfalls entsprechend der Zellzyklusanalyse wurde bei den Downregulations-Versuchen eine weitere Kontrolle „siRNA\_unbehandelt“ mitgeführt. Auch hier wurden für jede Versuchsreihe drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

In der Folge werden zu jeder Probe nur die Prozentzahlen der „apoptotischen Zellen“ besprochen, da diese den entscheidenden Effekt widerspiegeln. Der Anteil der „lebenden Zellen“ errechnet sich jeweils als Differenz zu 100 % und wird daher nicht zusätzlich erwähnt (vgl. 2.3.9, Abb. 18 b).

#### 3.4.1. Induktion von Apoptose bei untransfizierten „Wildtyp-ZR-75-1“

In der „Wildtyp-Versuchsreihe“ (Abb. 24 blaue Balken ) beträgt der Anteil an apoptotischen Zellen bei den unbehandelten Zellen 5 %, er steigt bei Dharmafect-Behandlung auf 5,475 % und mit DMSO auf 5,55 %. Eine Lapatinibbehandlung führt zu einer 60-prozentigen und somit nicht signifikanten Zunahme der Apoptose-Fraktion auf 8,95%. Auch Tamoxifen zeigt im Vergleich zur Dharmafect-Kontrolle (5,475 %) keinen statistisch signifikanten Effekt (Tamoxifen: 7,325 %).

#### 3.4.2. Induktion von Apoptose in Abhängigkeit des ErbB4-Knockdowns

Die Apoptose-Fractionen der unbehandelten und der Dharmafect-Kontrolle in der Versuchsreihe „ErbB4-Downregulation“ (Abb. 24 orangene Balken) kommen mit 5,25 % (unbehandelt) und 5,05 % (Dharmafect) den Werten aus den Wildtypversuchen (vgl. 3.4.1) sehr nahe. Ein Knockdown des ErbB4-Rezeptors erhöht die „apoptotischen Zellen“ auf 6,625 % (siRNA\_unbehandelt). Wird den Zellen zusätzlich DMSO zugesetzt, führt das fast keine weiteren Zellen in Apoptose (DMSO\_Kontrolle: 6,9 %). Dagegen zeigt Lapatinib, wie schon in den Quenching-Messungen, einen erheblichen Effekt. In diesem Fall steigert es die Apoptose-Fraktion von den genannten 6,9 % (DMSO) auf durchschnittlich 17,4 % (Lapatinib). Dies entspricht einer 150%-igen Zunahme und ergibt im Student-T-Test einen p-Wert von 0,02. Ebenfalls statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ) ist die Zunahme der „apoptotischen Zellen“ unter Zugabe von Tamoxifen von 5,05 % (Dharmafect) auf 10,525 % (Tamoxifen).

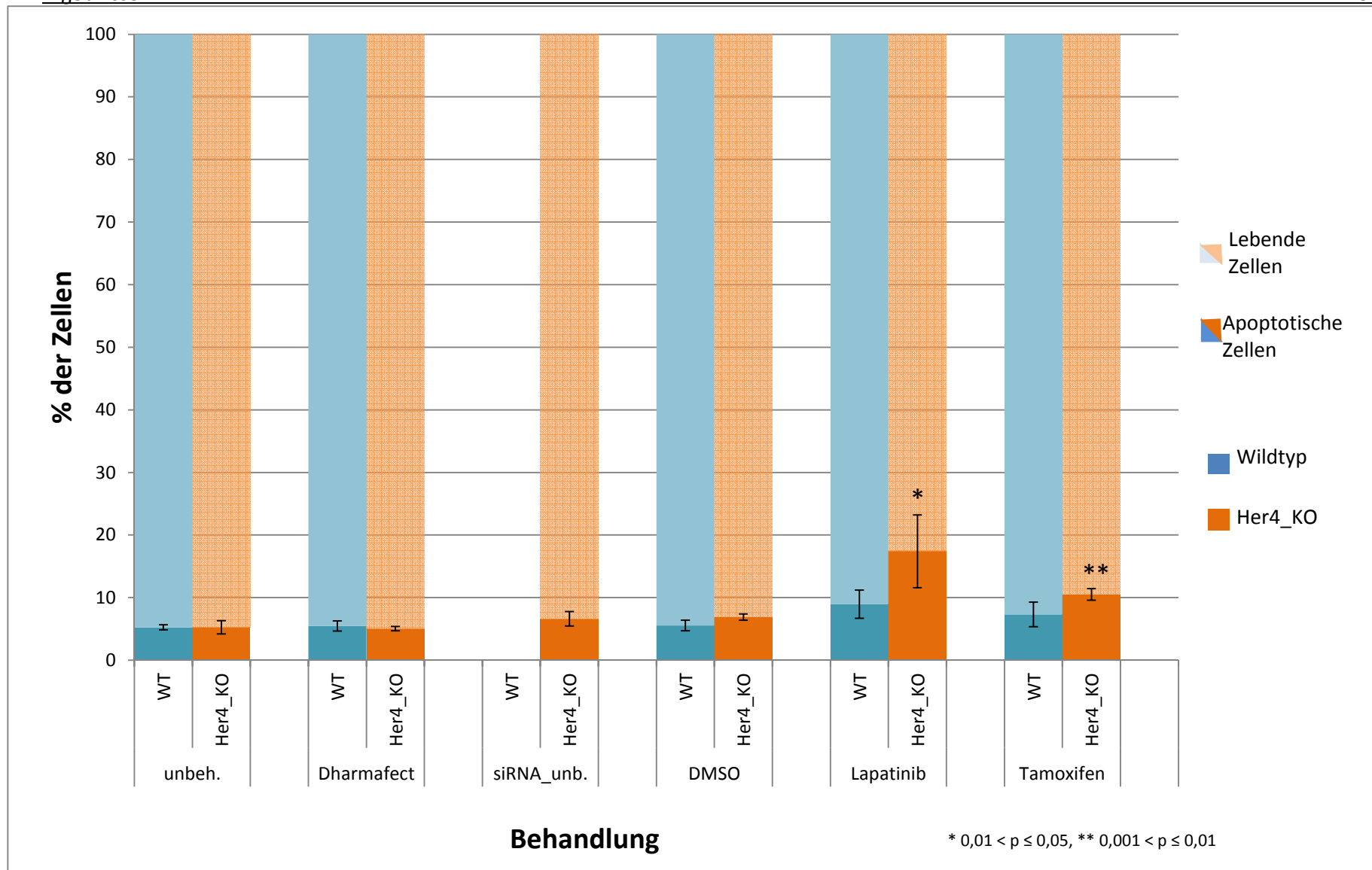


Abb. 24: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Annexin-Assays mit ZR-75-1 vor („Wildtyp“, blau) und nach („Her4\_KO“, orange) ErbB4-Knockdown. Dargestellt sind die Anteile von lebenden Zellen (hell) und apoptotischen Zellen (dunkel) in % in Abhängigkeit von den auf der Achse aufgetragenen Behandlungen.

P-Werte sind als Sternchen dargestellt und beziehen sich auf die jeweilige Kontrolle. Kontrolle für Lapatinib: DMSO, für Tamoxifen: siRNA\_unb.

### 3.5. Zellzahlbestimmungen

Ergänzend zu den Zellproliferations- und Apoptose-Assays wurden am Tag der Zellernte (Tag 7 in 2.1.2) die Zellzahlen nach entsprechender Behandlung mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Auch hier wurden aus den Werten der Einzelversuche die Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt. Abbildung 25 fasst die Ergebnisse der Zellzählungen für alle drei Versuchsreihen graphisch zusammen.

Der Trend, den man diesen absoluten Zahlen entnehmen kann, spiegelt die Beobachtungen der oben genannten Untersuchungen wider. Nachdem ursprünglich 500.000 Zellen pro T25-Flasche ausgesät worden waren, befanden sich bei unbehandelten ZR-75-1 aller drei Versuchsreihen nach einer Woche im Durchschnitt etwa 1 Million Zellen in der Flasche. Die Zugabe von Dharmafect ändert diese Zahl fast nicht. Die Wegnahme der beiden Rezeptoren hat eine Verringerung der Zellzahl auf circa 910.000 (ErbB4) bzw. 830.000 (ER) zur Folge. Auch hier scheint die Wegnahme des ER die Zellen somit mehr in ihrem Wachstum einzuschränken. Eine zusätzliche Behandlung mit Trastuzumab bzw. Pertuzumab wiederum äußert sich in keiner zusätzlichen Wachstumsbehinderung, im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen bleibt die absolute Zellzahl annähernd konstant.

Während auch eine DMSO-Zugabe eine annähernd gleich große Zellzahl wie die Kontrollen zeigt, ist sowohl bei einem Treatment mit Lapatinib als auch mit Tamoxifen ein deutlicher Effekt zu erkennen, sobald ein Rezeptor downreguliert wurde.

So verringert Lapatinib, dessen Zugabe im Wildtypversuch eine minimale Abnahme der Zellzahl zur Folge hat (1 Million auf 980.000), im ErbB4-Knockdown-Versuch die Zellzahl von 960.000 (DMSO) auf 580.000 und im ER-Knockdown-Versuch von 890.000 (siRNA\_unbehandelt) auf 550.000. Dies entspricht p-Werten von 0,05 (ErbB4) bzw. 0,02 (ER) im Student-T-Test.

Auch Tamoxifen führt zu einer deutlichen Abnahme der Zellzahl nach ErbB4-Knockdown (910.000 auf 630.000) im Gegensatz zu den Wildtypversuchen, wo durch seine Zugabe die Zellzahl lediglich von 1 Million auf 950.000 zurückging.

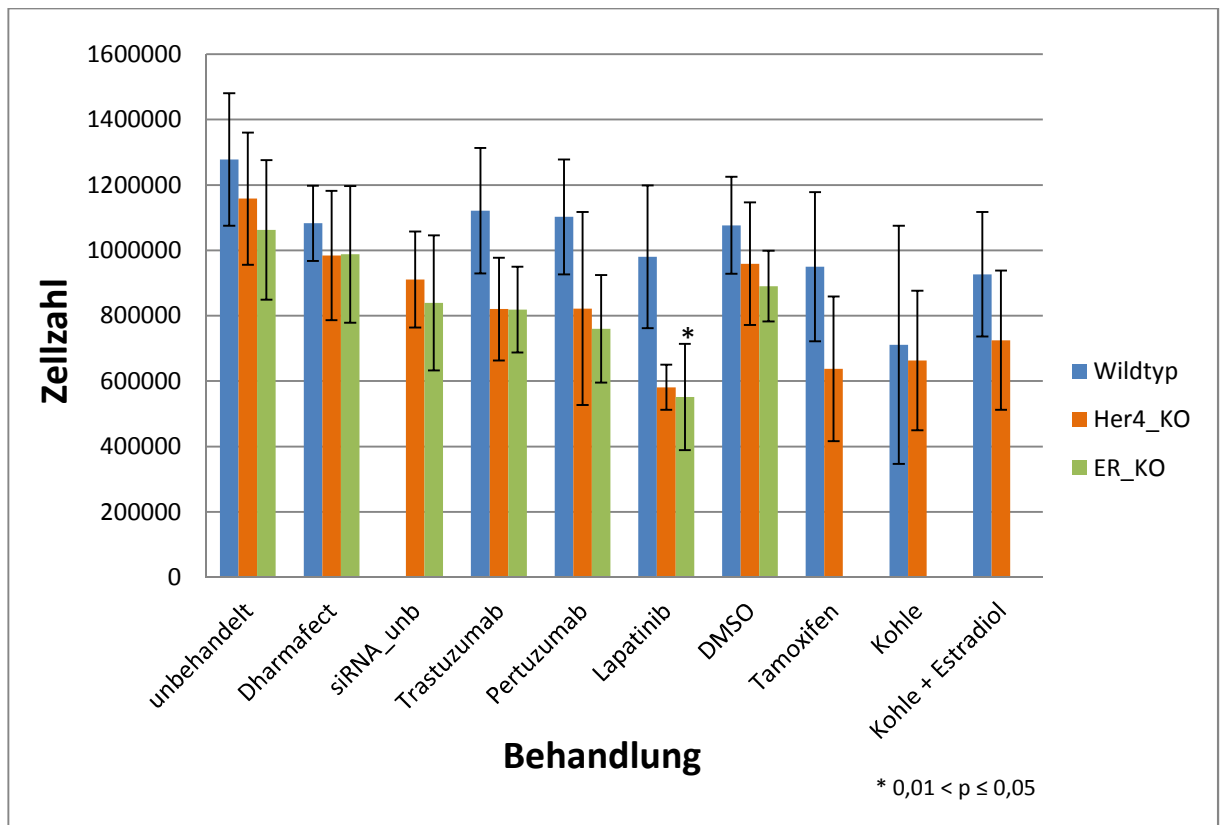


Abb. 25: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Zellzählungen aller 3 Versuchsreihen (blau: Wildtyp, orange: ErbB4-KO, grün: ER-KO). Aufgetragen ist die absolute Zellzahl, bestimmt in einer Neubauer Zählkammer, in Abhängigkeit von den auf der x-Achse aufgetragenen Behandlungen. P-Werte sind als Sternchen dargestellt und beziehen sich auf die jeweilige Kontrolle. Kontrolle für Lapatinib: DMSO.

### 3.6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend liefern die dargestellten Untersuchungen folgende Ergebnisse:

- Der ErbB4-Rezeptor:

Bei einem siRNA-induzierten Knockdown des ErbB4-Rezeptors bleibt die Expression der anderen ErbB-Rezeptoren (ErbB1-ErbB3) unverändert. Der ErbB4-Knockdown beeinflusst aber weder die Proliferations- noch die Vitalitätsrate von ZR-75-1 Zellen: Die G0-Zellzyklusfraktionen und die Apoptoserate bleiben unverändert.

- Der Estrogenrezeptor alpha:

Ein Knockdown des ER $\alpha$  hingegen hat einen deutlich erhöhten G0-Exit, d. h. eine erhöhte Fraktion „ruhender“, nicht proliferierender Zellen zur Folge. Die Rolle der Estrogene und ihrer Rezeptoren als wichtige Wachstumsfaktoren spiegelt sich auch in den erhöhten G0- und Apoptoseraten der Zellen wider, denen mittels Aktivkohle unter anderem Estrogene entzogen wurden.

- Die therapeutischen Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab:

Eine Behandlung von ZR-75-1 mit Trastuzumab und Pertuzumab hat keinen Einfluss auf den Zellzyklusexit oder die Vitalität der Zellen. Diese Beobachtung ist unabhängig von der Koexpression des ErbB4 bzw. des ER $\alpha$ , d. h. die Sensitivität gegenüber den therapeutischen Antikörpern wird durch einen Knockdown des ErbB4-Rezeptors oder des ER $\alpha$  nicht beeinflusst.



- Der niedermolekulare TKI Lapatinib:

Eine Behandlung mit Lapatinib zeigt nur eine geringe Wirkung auf die Wildtypzellen. Es führt zu einer leichten Zunahme des Zellzyklusexits, während die Apotoserate und die Gesamtzellzahl nach Behandlung hingegen unverändert bleiben.

Demgegenüber zeigt sich nach Knockdown des ErbB4 oder des ER $\alpha$  eine deutliche Zunahme der Sensitivität von ZR-75-1 Zellen. In den jeweiligen Versuchsreihen ist der G0-Exit hochsignifikant größer als bei den Wildtypzellen. Nach ErbB4-Knockdown kommt es auch zu einer signifikant gesteigerten Apoptoseinduktion. Dieser Effekt spiegelt sich auch in einer verminderten Gesamtzellzahl wider.

- Der ER $\alpha$ -Antagonist Tamoxifen:

Die Behandlung mit Tamoxifen zeigt als einziges verwendetes Therapeutikum einen Effekt in untransfizierten Wildtyp-ZR-75-1. In Folge der Behandlung steigt der Anteil der Zellen in G0 stark an. Apotoserate und Zellzahl ändern sich jedoch auch hier kaum. Ein ErbB4-Knockdown steigert ebenfalls die Sensitivität gegenüber einer Tamoxifenbehandlung. Es ist eine deutlich gesteigerte G0-Fraktion und eine signifikante Zunahme der Fraktion apoptotischer Zellen zu verzeichnen.

## 4. DISKUSSION

Der ErbB2-Rezeptor zählt zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGFR) und ist, in niedrigem Maße exprimiert, an der normalen Entwicklung von verschiedenem menschlichen Gewebe, wie Brust, Ovarien, Lunge, Leber, Niere und ZNS beteiligt. Bei verschiedenen Krebsformen, so auch beim Mammakarzinom, konnte jedoch eine Überexpression dieses Rezeptors nachgewiesen werden, die in den meisten Fällen auf eine Genamplifikation zurückzuführen ist. So weisen etwa 15% - 25% der invasiven Mammakarzinome eine Überexpression des ErbB2-Rezeptors auf, sodass auf einer Zelle bis zu 2 Millionen Rezeptoren gefunden werden konnten. Diese als ErbB2-positiver Subtyp definierte Untergruppe zeichnet sich durch die zweitschlechteste Prognose aller Brustkrebsformen aus und ist mit einem verkürztem krankheitsfreien und Gesamtüberleben assoziiert. Verschiedene Therapeutika gegen die extra- oder intrazelluläre Domäne des Rezeptors ebneten den Weg für eine target-spezifische Therapie des Mammakarzinoms. Studien zeigten eine deutliche Verbesserung des Krankheitsverlaufs durch Zusatz von Trastuzumab, Pertuzumab oder Lapatinib zu bisherigen Chemotherapie-Schemata. Trotz aller Therapieerfolge ist die durchschnittliche Wirkdauer der Medikamente nur mittelmäßig. Diese Beobachtung ist wohl auf de novo bzw. primäre als auch erworbene bzw. sekundäre Resistenzentwicklung der Brustkrebszellen zurückzuführen (vgl. 1.2.5.1). Es gibt verschiedene Erklärungsmodelle für diese Resistenzentwicklung (140, 141, 12). Dazu gehören sterische Effekte und intrazelluläre Umbauvorgänge in resistenten Zellen sowie die Hochregulierung anderer Rezeptoren aus der Familie der RTK (123, vgl. Abbildung 6). Nicht zuletzt wird immer wieder die gleichzeitige Koexpression weiterer ErbB-Rezeptoren zusätzlich zu ErbB2 als mögliche Ursache für die unterschiedliche Antwort auf ErbB2-Targeting diskutiert. Ein weiterer Rezeptor, der vielfältige Zellfunktionen und insbesondere Zellproliferation reguliert und dabei eng mit RTK wie den ErbB-Rezeptoren in Verbindung steht, ist der Estrogenrezeptor. Im Gegensatz zu den membranständigen RTK übt der ER als intrazellulärer Hormonrezeptor seine Funktion vor allem als Transkriptionsfaktor im Zellkern aus. Noch länger als für den ErbB2-Rezeptor ist seine proliferationssteigernde Wirkung auf Brustkrebszellen bekannt und machte ihn zum ersten Angriffspunkt für targeted therapy mit Tamoxifen (vgl. 1.3.3.2.1.). Doch auch bei dieser endokrinen Therapie wurden in den letzten Jahren vermehrt Resistenzentwicklungen beobachtet. Eine Ursache scheint ebenfalls im Crosstalk zwischen ErbB-Rezeptoren und ER $\alpha$  zu liegen. Mitglieder der ErbB-Familie aktivieren die PI3K- und MAPK-Signalwege, die wiederum über Phosphorylierung des ER $\alpha$  zu dessen Aktivierung führen können. Dazu passen auch klinische Untersuchungen, die eine Assoziation einer ErbB2-Überexpression mit niedrigeren Tamoxifen-Ansprechraten in Patientinnen mit ER $\alpha$ -positivem Mammakarzinom belegen (97). Ein besondere Rolle in dieser Interaktion könnte (neben dem ErbB2) auch der ErbB4-Rezeptor einzunehmen, dessen intrazelluläre Domäne als Ko-Aktivator oder ggf. als Ko-Repressor des ER $\alpha$  im Zellkern fungieren kann (vgl. 1.2.6.1.).

Die Beziehung zwischen der ER- und der ErbB-Rezeptorfamilie und ihre Auswirkung auf targeted therapy von Mammakarzinomzellen wurden in dieser Arbeit näher beleuchtet. Insbesondere wurde der Einfluss einer ErbB4-(Ko-)Expression auf das anti-ErbB2- bzw. anti ER-targeting untersucht. Zum Einsatz kam die Brustkrebszelllinie ZR-75-1, die eine vergleichsweise hohe Expression aller 3 Rezeptoren (ErbB2, ErbB4 und ER) mitbringt. Als ErbB2-Therapeutika wurden Trastuzumab, Pertuzumab und Lapatinib verwendet; zusätzlich wurden die Zellen mit dem ER-

Antagonisten Tamoxifen behandelt. Mit Hilfe von siRNA konnte der ErbB4- bzw. der Estrogenrezeptor downreguliert werden und somit die Effekte der einzelnen Targets in Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit dieses Rezeptors betrachtet werden.

#### 4.1. Die Effekte von ErbB2- und ER-Targeting auf „Wildtyp-ZR-75-1“

##### 4.1.1. Die Effekte der RTK-Antagonisten Trastuzumab, Pertuzumab und Lapatinib auf Proliferation, Apoptose und Zellzahl von „Wildtyp-ZR-75-1“

In allen Proliferationsmessungen zeigen sich die hier verwendeten ZR-75-1-Brustkrebszellen resistent gegenüber den monoklonalen ErbB2-Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab. Ihre Zugabe führt bei den Zellen weder zu einem erhöhten G0-Exit noch zu einer gesteigerten Apoptoserate. Dementsprechend ist die Zellvermehrung unter der Behandlung vergleichbar zu den Kontrollen. Diese Beobachtung konnte auch in weiteren Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe mit statischer Proliferationsanalyse bestätigt werden. Zusätzlich finden sich in der Fachliteratur mehrere Hinweise darauf. So sprechen sowohl Wilken et al. (124) als auch Berstad et al. (11) von ZR-75-1 als „Trastuzumab-resistenten Zellen“. Dies führt man hauptsächlich auf die fehlende Überexpression des ErbB2-Rezeptors in ZR-75-1 zurück. So sind diese Zellen zwar ErbB2-positiv, jedoch liegt keine Genamplifikation des zugrundeliegenden Genabschnitts vor, die wiederum in 97 % der Fälle ursächlich für die Überexpression des Rezeptors ist.

Aufgrund seines neuen Ansatzpunktes innerhalb der Rezeptordomänen des ErbB2 erhoffte man sich vom zweiten monoklonalen Antikörper Pertuzumab neue Therapiemöglichkeiten nicht nur für Trastuzumab-resistente Brustkrebszellen, sondern auch für solche mit moderaten ErbB2-Levels wie ZR-75-1. Doch auch hier konnte in den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen kein Einfluss auf Proliferation, Apoptose oder Zellzahl nachgewiesen werden. Dies deckt sich wiederum mit den Beobachtungen von Yuti Chernajovsky und Ahuva Nissim, die in ihrer Arbeit den Einfluss verschiedener monoklonaler ErbB2-Antikörper auf die Proliferation von Brustkrebszellen verschiedener Zelllinien mit unterschiedlicher ErbB2-Expression darstellen und bei einer Behandlung von ZR-75-1-Zellen mit Pertuzumab keine Verringerung der Proliferation zeigen konnten (20, Table 1).

Eine Lapatinib-Behandlung zeigt von den verwendeten ErbB2-gezielten Therapien sowohl in den Quenching- als auch den Apoptose-Messungen den größten Einfluss auf „Wildtyp-ZR-75-1“, auch wenn hier nur der Anstieg des G0-Anteils von 3,73 auf 6,55 % beim BrdU/Hoechst-Quenching einen leicht signifikanten Effekt darstellt ( $p=0,035$ ). Dies kann wohl vor allem durch die abweichende Wirkungsweise dieses Therapeutikums erklärt werden, das im Gegensatz zu den monoklonalen Antikörpern nicht die extrazelluläre Rezeptordomäne bindet, sondern als niedermolekularer Tyrosinkinaseinhibitor die intrazelluläre Signalweiterleitung blockiert. Dennoch geht aus einem Paper von Konecny et al. aus dem Jahre 2006 (62) hervor, dass auch die Sensitivität gegenüber Lapatinib mit einer ErbB2-Überexpression bzw. ErbB2-Genamplifikation assoziiert ist. Im Vergleich verschiedener Brustkrebszelllinien mit unterschiedlichen Expressionsleveln von ErbB2 ergab sich eine signifikante inverse Korrelation zwischen der Sensitivität gegenüber Lapatinib, gemessen anhand der IC50 in Zellzählungen, und der ErbB2-Expression. Für Zellen mit niedrigeren ErbB2-Levels inklusive ZR-75-1 war somit die Zugabe

signifikant höherer Lapatinib-Konzentrationen von Nöten, um eine halbmaximale Inhibition des Zellwachstums zu erreichen. Gleichzeitig nahm die notwendige IC<sub>50</sub> signifikant ab, sobald den Zellen künstlich ErbB2-Rezeptoren transfiziert worden waren. Auch wenn diese Ergebnisse überraschen, da man primär einen genau entgegengesetzten Zusammenhang, nämlich höhere Lapatinib-Konzentrationen bei höherer Rezeptorexpression, erwarten würde, lassen sie die Vermutung zu, dass die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Lapatinib stark von der ErbB2-Konzentration abhängig ist. Diese Beobachtung kann auch als Erklärungsansatz für die nur minimalen Auswirkungen einer Lapatinib-Behandlung in den hier dargestellten Wildtyp-Versuchen dienen.

#### 4.1.2. Die Effekte des ER-Antagonisten Tamoxifen auf Proliferation, Apoptose und Zellzahl von „Wildtyp-ZR-75-1“

Neben dem ErbB2-Rezeptor exprimieren die verwendeten ZR-75-1-Zellen auch den Estrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$  bzw. ER). Dies geht bereits aus dem Datenblatt der Zelllinie hervor (109), wurde jedoch speziell für die in unserem Labor verwendeten Zellen nochmal per Western-Blot belegt (siehe Abbildung 8). Die stark proliferationssteigernde Wirkung dieses Rezeptors auf Brustkrebszellen macht man sich schon lange für die Therapie mit ER-Antagonisten wie dem SERM Tamoxifen zunutze. Daher kam diese Behandlung auch bei den hier beschriebenen Versuchen zum Einsatz und auch hier wurde entsprechend zum ErbB2-Targeting sein Einfluss auf Proliferation und Apoptose untersucht. Wie auch schon beim Einsatz von Lapatinib fallen die Effekte einer Tamoxifenbehandlung in den Quenching-Messungen deutlicher aus als in den Apoptose-Assays. Während eine Tamoxifen Zugabe zu einer 300-prozentigen Zunahme der in G<sub>0</sub> befindlichen Zellen führt, steigt die Apoptosefraktion nur minimal an. In der Literatur findet man auch Belege, dass Tamoxifen die Progression von ZR-75-1-Tumoren in Mäusen nur in geringem Maß aufhalten kann (24, 42). Diese niedrigen Anspruchsdaten erklärt man u. a. damit, dass Tamoxifen als SERM nicht nur antagonistisch am ER $\alpha$  wirkt, sondern auch eine agonistische Komponente hat. Darüber hinaus wird auch immer wieder eine Resistenzentwicklung gegenüber Tamoxifen und endokriner Therapie beobachtet, die das Ansprechen selbstverständlich auch verringert.

#### 4.2. Einfluss einer ErbB4-Downregulation auf die antiproliferativen Effekte von ErbB2- und ER-Targeting in ZR-75-1

Mit verschiedenen Publikationen wurde gezeigt, dass die Expression weiterer Rezeptoren der ErbB-Familie zusätzlich zum ErbB2 Auswirkungen auf den Erfolg einer Behandlung gegen ErbB2 haben kann. So wird das Ansprechen verschiedener Brustkrebszelllinien auf Trastuzumab durch gleichzeitige Expression des EGFR beeinflusst und kann durch Downregulation des EGFR gesteigert werden (29). Daneben stellt ErbB3 den wichtigsten Partner zur Heterodimerisierung für ErbB2 und somit einen wichtigen Faktor für dessen Wirkungsweise dar. Obwohl ErbB3 selbst keine intrazelluläre Kinasedomäne aufweist, zeigt der Rezeptor ausgeprägte mitogene Effekte (47), welche die antiproliferative Wirkung von Trastuzumab abschwächen und die Ansprechraten auf den Antikörper herabsetzen (71). Darüber hinaus ist in Folge der Koexpression von EGFR und ErbB3-Rezeptor zum ErbB2-Rezeptor eine Resistenzentwicklung gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika (19) sowie Trastuzumab (118, 99) beschrieben. In dieser Arbeit wurden nun

die Koexpression des ErbB4-Rezeptors neben dem ErbB2-Rezeptor und ihre Effekte auf ErbB2- und ER-Targeting untersucht. Aufgrund des Crosstalks der unterschiedlichen ErbB-Rezeptoren und speziell den vielfältigen Funktionsweisen des ErbB4 wurde vermutet, dass dieser Rezeptor Einfluss auf die ErbB2- oder ER-Signalkaskade und somit auf deren Effekte nehmen könnte. Um dies untersuchen zu können, wurden die ursprünglichen „Wildtyp-ZR-75-1“, die den ErbB4-Rezeptor in hohem Maße exprimieren, mit siRNA gegen diesen Rezeptor transfiziert und dieser Rezeptor somit herunterreguliert. Nachdem gezeigt worden war, dass die siRNA-Tranfektion lediglich den ErbB4- und keinen der anderen ErbB-Rezeptoren bzw. deren Phosphorylierungsstellen betraf, konnten die entsprechenden Behandlungen an Zellen mit („Wildtyp-ZR-75-1“) sowie ohne („ErbB4-Downregulation“) ErbB4-Rezeptor getestet und diese Versuchsreihen in der Folge miteinander verglichen werden.

#### 4.2.1. Einfluss einer ErbB4-Downregulation auf ZR-75-1-Brustkrebszellen

Zunächst war festzustellen, dass der alleinige Knockdown des ErbB4-Rezeptors ohne zusätzliches Treatment („siRNA\_unbehandelt“) die Zellen weder in Proliferation noch in Apoptose beeinflusst. Sowohl die G0- als auch die Apoptose-Fraktionen weisen fast identische Werte zur Dharmafect-Kontrollgruppe auf. In der Literatur werden die Rolle des ErbB4-Rezeptors und sein Einfluss auf die Proliferation von Tumorzellen kontrovers diskutiert. Während mehrere Arbeiten auf eine wachstumshemmende Funktion des ErbB4 hinweisen, sprechen auch viele Daten für eine proliferationssteigernde Wirkung des Rezeptors. So resultieren Ansätze, den ErbB4-Rezeptor in verschiedenen Zellen ohne ErbB4-Expression künstlich zu exprimieren, einerseits in gesteigertem Tumorwachstum (77, 48) und andererseits in erhöhten Apoptoseraten (48, 85, 27). Eine aktuelle Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe, die die Expression der ErbB4-Isoformen in unterschiedlichen Brustkrebsgeweben untersuchte, konnte eine Assoziation von ErbB4-Expression und verlängertem Überleben der Patientinnen zeigen (78). Dies spricht wiederum für eine tumorsuppressive Wirkung des ErbB4. Auf der anderen Seite findet man jedoch Hinweise, dass eine ErbB4-Downregulation mit einer Tumorsuppression und verringerten Proliferationsraten assoziiert ist. Tang et al. führten 1998 und 1999 Versuche mit ER-positiven Brustkrebszellen durch, wobei der Knockdown anstelle von siRNA durch Ribozyme erreicht wurde. *In vitro* konnte nach ErbB4-KO eine Abnahme in der Koloniegröße der Zellen gemessen werden. *Xenograft* Tumoren in Mäusen zeigten nach Knockdown des ErbB4-Rezeptors ein geringeres Wachstum (116). Auch für andere Tumorentitäten wie Melanom (94), Bronchial- und Prostata-Karzinom (110, 120) konnte eine herabgesetzte Tumorbildung durch ErbB4-Knockdown gezeigt werden. Diese widersprüchlichen Ergebnisse, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, decken sich mit klinischen Daten zum Outcome und den Charakteristika ErbB4-positiver Mammakarzinome, die von gesteigerten bis zu erniedrigten Überlebensraten reichen. Tabelle 10 gibt einen kleinen Überblick über ausgewählte Daten zu diesem Thema. Auch wenn all diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression des ErbB4-Rezeptors Einfluss auf die Prognose von Krebspatientinnen nimmt, ist die Einordnung des Rezeptors als prognostischen Faktor immer noch Gegenstand aktueller Forschung. So setzt sich auch diese Arbeit mit dieser Frage auseinander.

<i>Favorable prognosis</i>			<i>Poor prognosis</i>		
Breast	Increased DFS	(Koutras et al 2008)	Breast	Decreased survival when nuclear	(Tovey et al 2006)
Breast	Tamoxifene-sensitivity	(Guler et al 2007)	Breast	Decreased survival when nuclear	(Junttila et al 2005)
Breast	Nonrecurrence and ER+	(Barnes et al 2005)	Breast	Decreased RFS in ER+ tumors	(Bièche et al 2003)
Breast	Increased DFS	(Abd El-Rehim et al 2004)	Breast	Decreased survival when cytoplasmic	(Lodge et al 2003)
Breast	ER+ and increased survival	(Witton et al 2003)	MB	CYT-1/CYT-2 ratio associates with more aggressive disease	(Ferretti et al 2006)
Breast	Increased DFS in ErbB2+ tumors	(Suo et al 2002)	MB	Decreased survival when co-expressed with ErbB2	(Gilbertson et al 1997)
Breast	Low grade when nuclear	(Srinivasan et al 2000)	Ependymoma	Enhanced proliferation when co-expressed with ErbB2	(Gilbertson et al 2002)
Breast	Differentiated phenotype	(Kew et al 2000)	CRC	Recurrence	(Baiocchi et al 2009)
Breast	ER+, PgR+, ErbB2-	(Bacus et al 1996)	CRC	LN+	(Kountourakis et al 2006)
Bladder	Downregulation associates with decreased survival	(Kassouf et al 2008)	CRC	Decreased OS when co-expressed with ErbB2	(Lee et al 2002b)
Bladder	Increased survival in tumors with EGFR or ErbB2	(Memon et al 2004)	SCC	Reduced survival when nuclear	(Xu et al 2008)
Thyroid	Small tumor size	(Wiseman et al 2008)	HNSCC	Metastasis and decreased survival	(Xia et al 1999)
			NSCLC	Resistance to chemotherapy	(Merimsky et al 2001)
			Sarcoma (osteo)	Poor response to chemotherapy and short DFS	(Merimsky et al 2003)
			Sarcoma (soft-tissue)	Resistance to chemotherapy and short DFS	(Merimsky et al 2002)

DFS disease-free survival, ER estrogen receptor, RFS relapse-free survival, LN lymph node, OS overall survival, PgR progesterone receptor, MB medulloblastoma, HNSCC head and neck squamous cell carcinoma, NSCLC non-small cell lung cancer

Tab. 10: Übersicht über klinische Studien zum ErbB4-Rezeptor als prognostischen Faktor: Assoziation der ErbB4-Expression mit Krankheit und Überleben (48, Table 4).

Links: Auflistung von Studien, die den ErbB4-Rezeptor als positiv prognostischen Faktor in Tumorerkrankungen einordnen.

Rechts: Auflistung von Studien, die den ErbB4-Rezeptor mit einem negativen prognostischen Effekt in Tumorerkrankungen assoziieren.

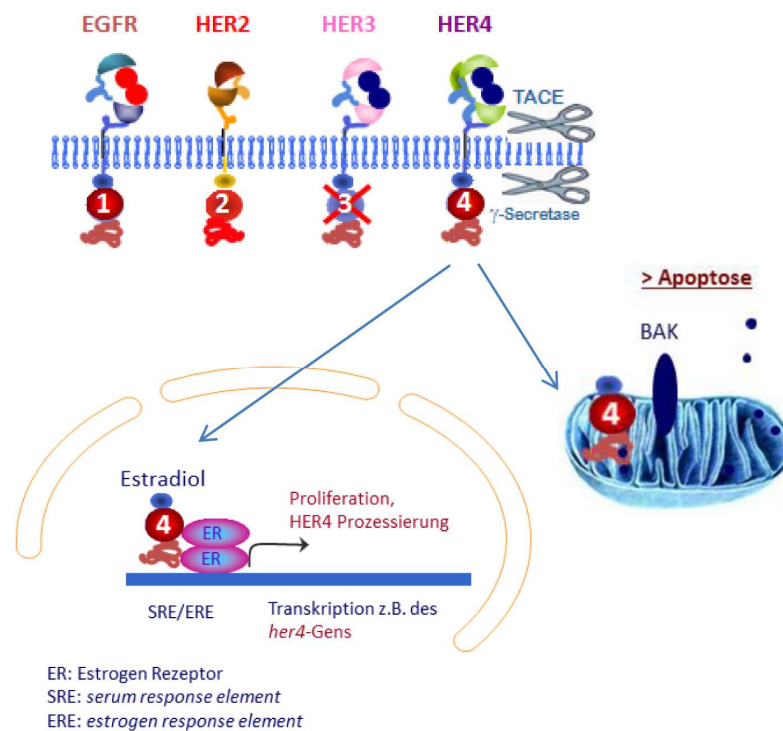


Abb. 26: Ambivalente Funktion des ErbB4-Rezeptors.

Dargestellt sind die 4 Vertreter der ErbB-Rezeptorfamilie (EGFR, Her2, Her3, Her4) mit ihren extra- und intrazellulären Domänen. Der ErbB3-Rezeptor weist keine intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne auf. Eine besondere Rolle nimmt der ErbB4-Rezeptor ein, dessen intrazelluläre Domäne enzymatisch abgespalten werden kann. Diese sogenannte 4ICD ist auch für die ambivalente Funktion des Rezeptors verantwortlich. Im Gegensatz zu den übrigen ErbB-Rezeptoren kann die intrazelluläre ErbB4-Domäne einerseits in den Zellkern übertreten und dort als Ko-Aktivatoren verschiedener Transkriptionsfaktoren (hier anhand des ER dargestellt) Proliferationsprozesse in Gang setzen, andererseits jedoch auch mit den Mitochondrien im Zellinneren interagieren und über diesen Weg Apoptose initiieren (85).

#### 4.2.2. Einfluss einer ErbB4-Downregulation auf die antiproliferativen Effekte der RTK-Antagonisten Trastuzumab, Pertuzumab und Lapatinib in ZR-75-1

Zusätzlich zum ErbB4-Knockdown wurden die Zellen anschließend den gleichen Treatments, wie vorher für „Wildtyp-ZR-75-1“ beschrieben, ausgesetzt und deren Einfluss auch entsprechend in Quenching- und Apoptose-Messungen untersucht. Hier fällt zunächst auf, dass sich die Sensitivität gegenüber Trastuzumab und Pertuzumab in keinsten Weise ändert. Die beiden monoklonalen Antikörper zeigen keine Effekte auf Proliferationsebene (siehe 3.3.3.).

Umso bemerkenswerter ist die Beobachtung, dass unter ErbB4-Knockdown die Sensitivität gegenüber Lapatinib deutlich zunimmt. Besonders in den G0-Berechnungen ergab sich eine hoch signifikante Zunahme ( $p < 0,001$ ). Aber auch bei der Bestimmung der Apoptose-Fraktion zeigt Lapatinib nach ErbB4-KO im Gegensatz zu den Wildtypversuchen ein signifikantes Ergebnis ( $p < 0,05$ ). Dabei muss hinzugefügt werden, dass bei den Annexin-V-Apoptose-Assays durch Gaten im FSC/SSC-Blot nur Einzelzellen zur Auswertung kamen. Dadurch wurde Zellschrott ausgeschlossen und somit nicht berücksichtigt, obwohl auch sein Absterben als Folge der Behandlung gesehen werden kann. So konnte besonders nach einer Zellbehandlung mit Lapatinib nach ErbB4-KO neben der genannten Steigerung der Apoptosefraktion auch eine sichtbare Vergrößerung der „Zellwolke“ beobachtet werden, die hauptsächlich Zelltrümmer darstellt und daher in den zahlenmäßigen Ergebnissen nicht zum Ausdruck kommt. Dennoch unterstreicht auch dies die Apoptose induzierende Wirkung von Lapatinib in den ErbB4-KO-Versuchen. Abbildung 27 stellt

diese Beobachtung graphisch dar, indem sie die Original-FSC/SSC-Blots von „unbehandelt“, „siRNA\_unbehandelt“ und „Lapatinib“ gegenüberstellt.

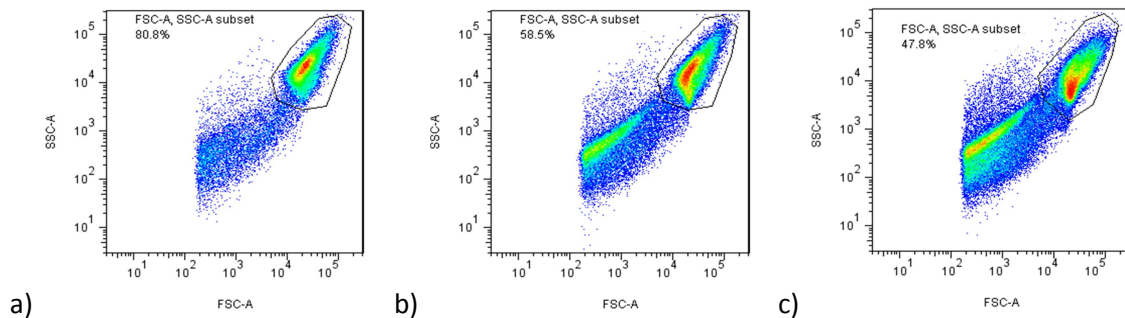


Abb. 27: Originalbilder aus den Annexin-V-FITC-Apoptose-Assays in der Versuchsreihe „ErbB4-Downregulation“: Aufgetragen SSC-A gegen FSC-A zur Aussortierung von Zelldubletten und –debris.

- a) Probe unbehandelt
- b) Probe anti-ErbB4 siRNA\_unbehandelt
- c) Probe Lapatinib behandelt

Man erkennt eine deutliche Zunahme von Zelldebris, was einer größeren Zahl an Zellschrott und toten Zellen entspricht. Gleichzeitig wird deutlich, dass diese Zellen durch das Gating aussortiert werden und daher in den endgültigen Ergebnissen nicht zum Ausdruck kommen. Dennoch unterstreicht auch diese größere Zellwolke den gesteigerten Effekt von Lapatinib unter ErbB4-Downregulation.

Die Beobachtung, dass die Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit Lapatinib nach ErbB4-Knockdown zunimmt, scheint neu zu sein: Man findet in der Literatur keine Hinweise auf eine Assoziation von Lapatinib-Zellbehandlung und dem ErbB4-Rezeptor. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Lapatinib, obwohl es als dualer TKI von EGFR und ErbB2 gilt, konzentrationsabhängig alle aktiven ErbB-Kinasen, somit auch ErbB4, blockiert (95, 127). Während sich die Aktivität von EGFR (ErbB1) und ErbB2 eindeutig proliferationssteigernd auf Tumoren auswirkt, gibt es für ErbB4, wie besprochen, gleichzeitig auch Belege für Proliferationsinhibition und Apoptosesteigerung (siehe 1.2.6.4.). Geht man von dieser Funktionsweise des ErbB4-Rezeptors aus, würde seine gleichzeitige Blockade die positiven Effekte einer EGFR-/ ErbB2-Blockade abschwächen. Dies ist der einzige Erklärungsansatz für das hier erstmals beobachtete Phänomen. In „Wildtyp-ZR-75-1“, die ErbB4 exprimieren, werden durch Lapatinib die eigentlichen Anti-Tumor-Eigenschaften des ErbB4 blockiert und dadurch auch die Wirkung der ErbB2- und EGFR-Blockade herabgesetzt. Nach siRNA-Zugabe ist nun kein ErbB4-Rezeptor und folglich keine Kinsedomäne vorhanden, die Lapatinib blockieren würde. Somit könnten die Anti-ErbB2- und Anti-EGFR-Effekte von Lapatinib überwiegen, die zu den erhöhten G0-Raten führen (vgl. Abb. 28).



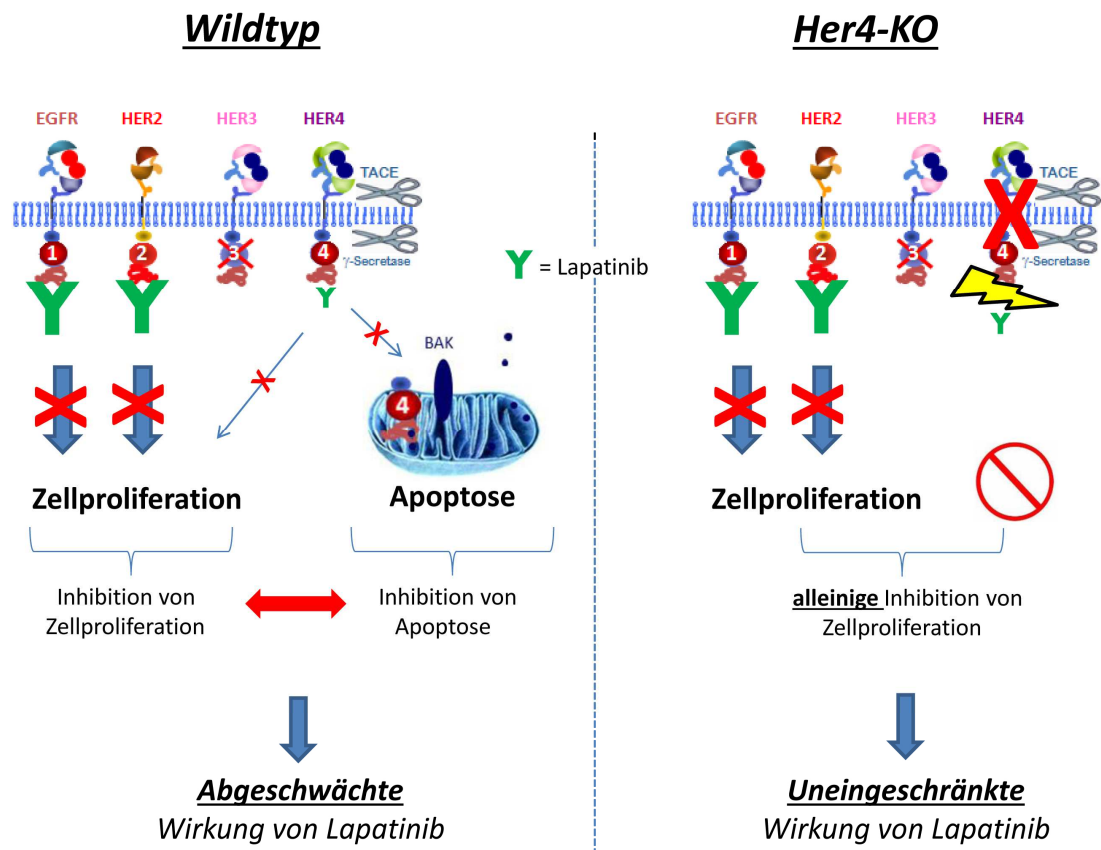


Abb. 28: Schaubild zur Erklärung der gesteigerten Wirksamkeit von Lapatinib nach ErbB4-Knockdown: Dargestellt ist die Wirkungsweise des niedermolekularen TKI Lapatinib vor (links) und nach (rechts) ErbB4-Knockdown in Zellen der Zelllinie ZR-75-1, die alle 4 ErbB-Rezeptoren (EGFR, ErbB2, ErbB3 und ErbB4) exprimieren. Es konnte gezeigt werden, dass Lapatinib neben den Tyrosinkinasen von EGFR und ErbB2 in geringerem Maße auch die intrazelluläre Domäne von ErbB4 blockiert. Dieser letztgenannte Rezeptor ist über Abspaltung seiner intrazellulären Domäne in der Lage, neben Zellproliferation auch Apoptose zu induzieren. Links: Bei den Wildtypzellen mit exprimiertem ErbB4 führt die Blockade der beschriebenen Apoptose-Funktion des ErbB4 zu einem abgeschwächten Effekt von Lapatinib. Rechts: Nach ErbB4-KO fällt die Blockade des ErbB4 weg und somit auch die Inhibition der Apoptose. Lapatinib kann gegenüber den erhaltenen Rezeptoren EGFR und ErbB2 seine volle Wirkung entfalten. Hierüber kann man sich die gesteigerte Sensitivität von ZR-75-1 gegenüber Lapatinib nach ErbB4-Knockdown erklären.

#### 4.2.3. Einfluss einer ErbB4-Downregulation auf die antiproliferativen Effekte des ER-Antagonisten Tamoxifen in ZR-75-1

Ähnliche Ergebnisse wie bei Lapatinib- konnten auch bei einer Tamoxifen-Behandlung nach ErbB4-Downregulation beobachtet werden. Auch wenn Tamoxifen im Gegensatz zu Lapatinib bereits in den „Wildtyp-Quenchingversuchen“ signifikant die Proliferation der Zellen inhibierte, nahm dieser Effekt nach Wegnahme des ErbB4-Rezeptors deutlich zu. Einer 300-prozentigen Steigerung der in G0 befindlichen Zellen bei den „Wildtypversuchen“ steht eine im Durchschnitt knapp 500-prozentige Zunahme nach ErbB4-Downregulation gegenüber. Und auch der Anteil an Zellen, die durch Tamoxifen in Apoptose versetzt werden, steigt bei ErbB4-Downregulation signifikant an ( $p < 0,01$ ), während dies bei Anwesenheit des Rezeptors nicht der Fall war.

Dass die ErbB-Rezeptoren im Allgemeinen in enger Verbindung mit dem Estrogenrezeptor, der den Angriffspunkt für Tamoxifen darstellt, stehen und die beiden Rezeptoren bzw. ihre Signalmoleküle sich gegenseitig beeinflussen, wurde bereits vielfach gezeigt und auch in dieser Arbeit schon beschrieben. Der ErbB4-Rezeptor nimmt in diesem Zusammenhang aber eine besondere Stellung ein. Zunächst besteht eine starke Korrelation zwischen ErbB4-Expression und ER-Positivität (55). Zusätzlich besitzt ErbB4 als einziger Rezeptor seiner Familie die Eigenschaft, nach Ligandenbindung eine intrazelluläre Domäne (4ICD) abzuspalten, die direkt mit dem ebenfalls intrazellulär lokalisierten ER interagieren kann. Die nukleäre Translokation von 4ICD wird durch Estrogen, den wichtigsten ER-Liganden, induziert und benötigt gleichzeitig Liganden-gebundenen ER $\alpha$ . 4ICD bildet im Zellkern einen Komplex mit ER $\alpha$  und wirkt somit als starker transkriptionaler Ko-Regulator des ER $\alpha$ . Als Komplex binden sie selektiv an Genpromotoren, die ERE enthalten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das ErbB4-Gen selbst ein Estrogen-induzierbares Gen ist, dessen Promoter ebenfalls ERE aufweist. Nach Estrogenstimulation von T47D-Mammakarzinomzellen nahm die ErbB4-mRNA-Expression in den Zellen signifikant zu. Das würde bedeuten, dass ErbB4 seine eigene Estrogen-stimulierte Expression in Brustkrebszellen reguliert und somit einen autokrinen ER/ErbB4-Signalkreis antreibt (132), der wiederum die Proliferation von Brustkrebszellen induziert.

Diese Erkenntnis lässt sich auch auf die in dieser Arbeit beobachtete Sensitivitätssteigerung von Brustkrebszellen ZR-75-1 gegenüber Tamoxifen übertragen. Nämlich insofern, dass die Zellen in Anwesenheit des ErbB4 durch die Komplexbildung aus 4ICD und ER $\alpha$  verstärkt zur Proliferation angetrieben werden und die Effekte von Tamoxifen dadurch abgeschwächt werden. Entzieht man den Zellen mittels siRNA nun einen der Partner, nämlich den ErbB4, kann diese Aktivierungsschleife nicht mehr stattfinden. Daher verwundert es zwar, dass die alleinige ErbB4-Downregulation die Zellen nicht ihrer Proliferation bremst, gleichzeitig lässt sich dadurch aber die gesteigerte Wirkung von Tamoxifen erklären. Erstens wird seine Funktion nicht durch die proliferationssteigernde Wirkung des ErbB4 eingeschränkt und zweitens liegt ER nicht in einem Komplex mit 4ICD vor, was möglicherweise den Angriff des SERM Tamoxifen am Rezeptor erleichtert. Die Abbildung 29 stellt diesen Erklärungsansatz graphisch dar.

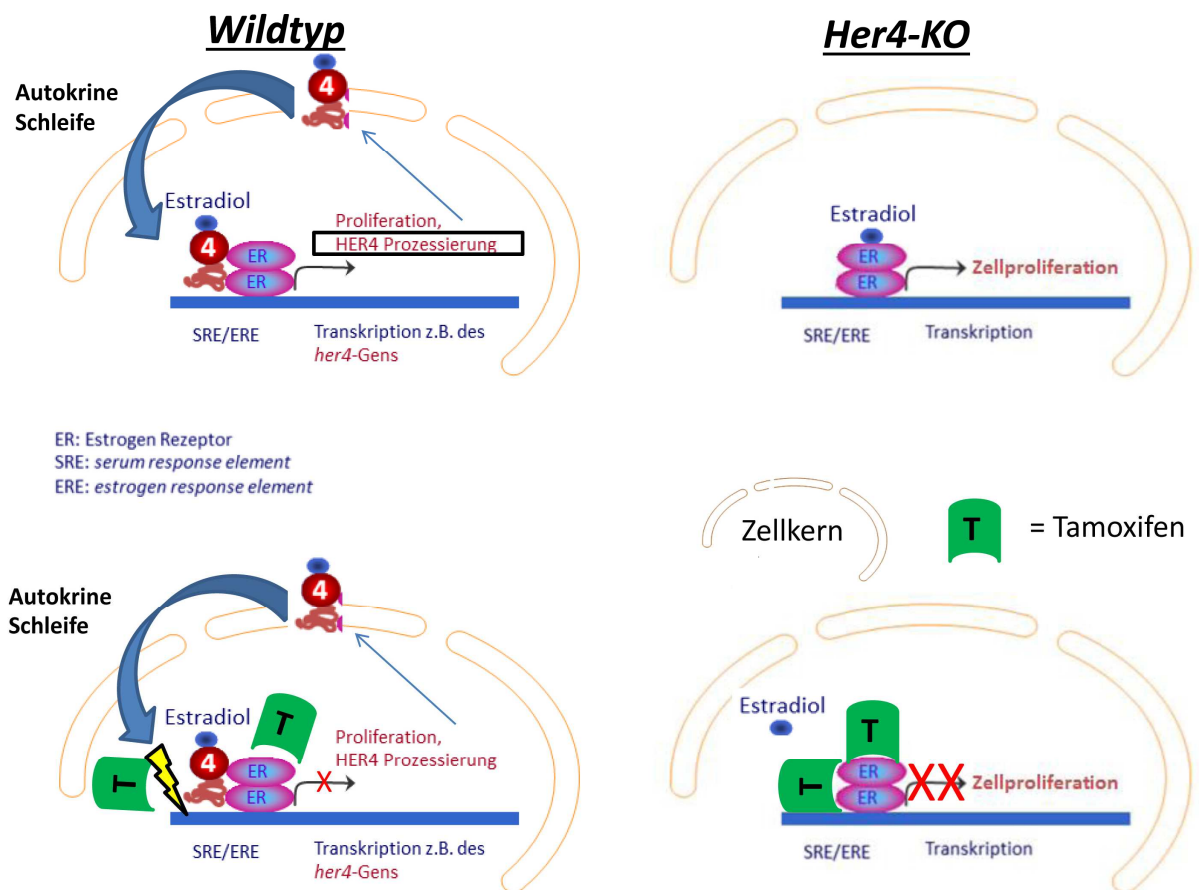


Abb. 29: Schaubild zur Erklärung der gesteigerten Wirksamkeit von Tamoxifen nach ErbB4-Knockdown:

Dargestellt ist die Wirkungsweise des *Selektiven Estrogenrezeptormodulators (SERM)* Tamoxifen in Mammakarzinomzellen vor (links) und nach (rechts) ErbB4 (Her4)-Knockdown.

Tamoxifen bindet innerhalb des Zellkerns an den als Dimer vorliegenden Estrogenrezeptor (ER) und blockiert in der Folge dessen Wirkung als Transkriptionsfaktor.

Links: Die intrazelluläre Domäne des ErbB4-Rezeptors (4ICD) gelangt in den Zellkern und fungiert nach Bindung von Estradiol als Ko-Aktivator des ER. Dies führt in der Folge zur Transkription von Genen, die die Zellproliferation antreiben. Unter anderem wird auch das Gen des ErbB4-Rezeptors selbst durch ER reguliert und vermehrt transkribiert, sobald ErbB4 bindet. Das bedeutet, dass ErbB4 seine eigene Transkription stimuliert. Dieser Zyklus wird als autokrine Schleife bezeichnet.

Bei Anwesenheit des ErbB4 und seiner intrazellulären Domäne ist aus sterischen Gründen die Bindung von Tamoxifen an ER im Zellkern erschwert. Zusätzlich wird durch die proliferationssteigernde autokrine Schleife über ErbB4 die Wirkung von Tamoxifen herabgesetzt.

Rechts: Nach Knockdown des ErbB4-Rezeptors findet die autokrine Schleife nicht statt. Gleichzeitig liegt der ER im Zellkern unbesetzt vor, Tamoxifen kann ungehindert binden und die Proliferation der Zellen inhibieren.

Man findet einen weiteren möglichen Erklärungsansatz für das beschriebene Phänomen in der Literatur. Bemerkenswerterweise konnte gezeigt werden, dass der *selektive Estrogenrezeptor-Downregulator (SERD)* Fulvestrant zwar das Wachstum verschiedener Brustkrebszelllinien signifikant hemmt, aber gleichzeitig auch die Phosphorylierung von ErbB3 und auch ErbB4 und dadurch auch die Sensitivität der Zellen gegenüber HRGβ1, einem wichtigen Liganden dieser beiden Rezeptoren, unter Fulvestrant-Behandlung zunimmt. Auch nachgeschaltete Signalwege wie ERK1/2 wiesen eine verstärkte Basalphosphorylierung unter Fulvestrant auf, wodurch die Effekte des Antihormons auf ERK1/2 fast vollkommen aufgehoben wurden (51). Auch wenn sich diese Daten auf Experimente mit dem SERD Fulvestrant anstelle von Tamoxifen (SERM) (siehe

1.3.3.2.) beziehen, könnten sie aufgrund der ähnlichen Funktionsweisen der beiden Therapeutika eventuell auch auf Tamoxifen übertragen werden – auf jeden Fall lassen sich Parallelen erkennen. Geht man von den mit Fulvestrant erhobenen Daten aus, könnte man auch hier argumentieren, dass in den Wildtypversuchen durch eine Antihormon (hier Tamoxifen) induzierte gesteigerte Phosphorylierung des ErbB4 die Tamoxifen-Effekte gedämpft werden und daher geringer als erwartet ausfallen. Nach ErbB4-KO hingegen steht kein Rezeptor mehr zur Verfügung, der vermehrt phosphoryliert und somit aktiviert werden könnte. Daher kommt in diesen Versuchen die Wirkung der Antihormon-Therapie deutlicher zum Ausdruck.

Des Weiteren weisen verschiedene Artikel darauf hin, dass Signalkaskaden der RTK, zu denen auch ErbB4 und die anderen ErbB-Rezeptoren zählen, negativ Einfluss auf das Ansprechen gegenüber endokriner Therapie nehmen. Die Sensitivität gegenüber Therapien gegen den ER $\alpha$  kann demnach herabgesetzt werden durch (a) direkte Steigerung der ER $\alpha$ -Funktion über erhöhte Phosphorylierung, (b) durch Aktivierung der AF-1-Domäne des Rezeptors (4), (c) oder indirekt über die Rekrutierung von Koaktivatoren des ER $\alpha$  (90), die in einer gesteigerten Transkriptionsrate des Rezeptors resultiert. In diesem Fall fällt mit dem ErbB4-Rezeptor eine möglicherweise entscheidende, RTK-vermittelte Funktion weg, sodass eine anti-ER $\alpha$ -Therapie mit Tamoxifen eine größere Wirkung entfalten kann.

Im Gegensatz zu diesen Überlegungen steht die beschriebene Wirkung von membrangebundenen RTK und ihren angeschlossenen Signalmolekülen, die ER $\alpha$ -Expression (128, 87) und –Funktion (26) zu unterdrücken beziehungsweise sogar eine Konversion von einem ER-positiven zu einem ER-negativen Phänotyp zu bewirken (25). Auch diese letztgenannte Konversion würde natürlich eine endokrine Resistenz nach sich ziehen.

Diese drei Theorien sind als Anregung für weiterführende Untersuchungen zu verstehen, um die in dieser Arbeit erstmals beobachteten Ergebnisse einer unter ErbB4-KO gesteigerten Tamoxifen-Wirkung zu erklären. Es steht fest, dass sich die beiden Signalwege von RTK und ER gegenseitig stark beeinflussen und keineswegs nur einzeln gesehen werden dürfen. Gerade aufgrund der dargestellten kontroversen Beobachtungen wird immer wieder der gleichzeitige Einsatz von gegen RTK und ER $\alpha$  gerichteten Therapien beim ER $\alpha$ -positiven Mammakarzinom diskutiert und untersucht (siehe Ausblick). Es bedarf weiterer, experimenteller Belege, um die molekularen Zusammenhänge zwischen dem ErbB- und ER-System klinisch-therapeutisch nutzen zu können.

#### 4.2.4. Zusammenfassende Betrachtung des Einflusses einer ErbB4-Downregulation auf die antiproliferativen Effekte von ErbB2- und ER-Targeting in ZR-75-1

Während ein Knockdown des ErbB4-Rezeptors auf den Effekt von Trastuzumab und Pertuzumab keinerlei Einfluss hat, nimmt die Wirkung sowohl von Lapatinib als auch Tamoxifen nach ErbB4-Knockdown verglichen mit den Versuchen mit Wildtypzellen auf Proliferations- und Apoptoseebene deutlich zu. Diese Beobachtung ist für beide Therapeutika neu und wurde in dieser Weise noch nicht beschrieben. Sucht man nach Erklärungen für die Sensitivitätssteigerungen, fällt auf, dass man einerseits für Lapatinib mit der proliferationsinhibierenden Wirkung des ErbB4-Rezeptors und andererseits im Falle des Tamoxifens mit seiner proliferationssteigernden Wirkung argumentieren kann. Diese ambivalente Funktionsweise, die sicher auch auf die (potentielle) Abspaltung der intrazellulären Domäne 4ICD zurückzuführen ist, scheint diesen Rezeptor von den anderen Vertretern der ErbB-Rezeptorfamilie zu unterscheiden und ursächlich dafür zu sein, dass er so schwer als prognostischer Faktor für das Mammakarzinom eingeordnet werden kann. Es gibt einerseits verschiedene Hinweise, dass 4ICD als transkriptionaler Ko-Regulator des ER im Zellkern proliferationssteigernd wirkt. Hierüber könnte die Wirkungszunahme Tamoxifens in den beschriebenen ErbB4-Downregulations-Versuchen erklärt werden, da nach Wegnahme des ErbB4-Rezeptors die autokrine Proliferationsschleife nicht mehr ablaufen kann und der ER als Target für Tamoxifen frei vorliegt. Andererseits ist für den ErbB4-Rezeptor auch mehrfach eine proliferationshemmende Wirkung und Apoptoseinduktion beschrieben. Da diese Effekte nach Knockdown des Rezeptors wegfallen würden, könnte die Wirkung von Lapatinib in diesen Versuchen daher uneingeschränkt zum Ausdruck kommen und gegenüber Wildtypversuchen zunehmen.

Wahrscheinlich spielen beide Wirkungen, die sich auch in den klinischen Daten widerspiegeln, für die Funktion dieses Rezeptors eine wichtige Rolle und weder die eine noch die andere Richtung sollte vernachlässigt werden. Es ist denkbar, dass - je nach zellphysiologischem Kontext - entweder die eher tumorigene, oder die tumorsuppressive Funktion des ErbB4-Rezeptors zum Tragen kommt. Die hier beobachteten Ergebnisse können nach aktuellem Stand der Literatur noch nicht endgültig erklärt werden und müssen daher in weiterführenden Experimenten beleuchtet werden.

#### 4.3. Einfluss einer ER $\alpha$ -Downregulation auf die antiproliferativen Effekte von ErbB2-Targeting in ZR-75-1

##### 4.3.1. Einfluss einer ER $\alpha$ -Downregulation auf ZR-75-1-Brustkrebszellen

Als (Negativ-)Kontrolle für die Behandlungen wurde eine Zellprobe, die nur mit anti-ER $\alpha$  siRNA transfiziert wurde, bei den Experimenten mitgeführt. Damit konnte der Einfluss eines alleinigen Rezeptor-Knockdowns auf die Proliferation der Zellen festgestellt werden (vgl. „siRNA\_unbehandelt“). Im Gegensatz zur ErbB4-Downregulation, die ohne zusätzliches Treatment der Zellen keinen Effekt hat, werden die Zellen bereits durch alleinige Wegnahme des ER deutlich in ihrer Proliferation gebremst. Unter Berücksichtigung der vielfältigen Funktionsweisen des ER $\alpha$ , über die er Proliferation von Brustkrebszellen anstößt (siehe 1.3.3.1.), ist dieses Ergebnis nicht überraschend. Im Gegenteil bestätigt die Verdopplung der G0-Fraktion

nach Rezeptorknockdown ( $p < 0,002$ ) die Rolle von Estradiol und seines Rezeptors ER $\alpha$  als enorm wichtige Wachstumsstimuli für Brustkrebszellen. Dieser Aspekt spiegelt sich auch in Wildtyp- sowie ErbB4-Downregulationsversuchen in den Ergebnisse der Proben wider, die FKS erhielten, das durch Aktivkohle filtriert worden war. Der daraus resultierende Entzug wichtiger Wachstumsfaktoren, die in ungefiltertem FKS enthalten sind, äußerte sich in einem drastischen Anstieg der G0-Fraktion der Zellen. Gleichzeitig ging dieser Anteil der Zellen auch wieder zurück, sobald man ihnen zum Aktivkohle filtrierten FKS  $\beta$ -Estradiol als Wachstumsstimulus hinzugab (siehe Abbildung 23).

#### 4.3.2. Einfluss einer ER $\alpha$ -Downregulation auf die antiproliferativen Effekte der RTK-Antagonisten Trastuzumab, Pertuzumab und Lapatinib in ZR-75-1

Ausgehend von der durch die alleinige siRNA-Zugabe ausgelösten Proliferationshemmung konnten - wie auch schon nach ErbB4-Knockdown – durch die Behandlung mit den monoklonalen Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab keine weiteren Zellen in die G0-Phase überführt werden. Demgegenüber führt eine Lapatinib-Behandlung im Vergleich zur „DMSO-Kontrolle“ erneut eine signifikante Steigerung der in G0 befindlichen Zellen herbei ( $p < 0,002$ ). Es ist schon seit langem bekannt, dass ca. 10 % der ER $\alpha$ -positiven Mammakarzinome auch eine Überexpression des ErbB2-Rezeptors aufweisen. Neuere präklinische Studien zeigen jedoch, dass die Entwicklung einer erworbenen endokrinen Resistenz gehäuft mit einer moderaten adaptiven Hochregulierung des ErbB2-Rezeptors einhergeht (60). Auf die hier beschriebenen Experimente übertragen, könnte man den Entzug des eigentlich vorhandenen ER $\alpha$  als erworbene „endokrine Resistenz“ bezeichnen. Kam es in der Folge zum beschriebenen Anstieg der ErbB2-Expression, könnte man darüber die Sensitivitätssteigerung gegenüber Lapatinib erklären, welches nach Konecny et al. umso besser wirkt, je stärker ErbB2 überexprimiert vorliegt (62). Ob der ER $\alpha$  Knockdown tatsächlich eine erhöhte ErbB2-Expression nach sich zieht, wäre experimentell noch zu belegen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegenden Daten zeigen, dass unter ErbB4-Knockdown die Sensitivität von ZR-75-1-Brustkrebszellen sowohl gegenüber Lapatinib als auch Tamoxifen zunimmt. Diese beiden Therapeutika verringern nicht nur die Proliferation dieser Zellen, indem sie mehr Zellen in die G0-Phase überführen, sondern führen auch zu höheren Apoptoseraten. Diese Wirkungssteigerung kann für Lapatinib ebenso unter Knockdown des Estrogenrezeptors- $\alpha$  beobachtet werden. Gegenüber den beiden monoklonalen ErbB2-Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab hingegen scheint diese Zelllinie eine Resistenz aufzuweisen, die auch nach Knockdown der genannten Rezeptoren bestehen bleibt. Dies belegt die Bedeutung einer ErbB2-Überexpression, die in ZR-75-1 nicht gegeben ist, als entscheidende Voraussetzung für die Wirksamkeit dieser Behandlungen.

Allgemein machen die beschriebenen Ergebnisse den engen Zusammenhang zwischen dem ER $\alpha$  und den RTK, zu denen auch ErbB4 aus der Familie der ErbB-Rezeptoren gehört, und ihren Signalwegen deutlich. Die Tatsache, dass sich die beiden Rezeptortypen in ihrer Funktion sowohl verstärken als auch blockieren können, lässt verschiedene Erklärungsansätze für die beobachteten Effekte von Lapatinib und Tamoxifen zu. Fakt ist, dass sich der ErbB4-Rezeptor durch seine abspaltbare intrazelluläre Domäne 4ICD von den anderen Mitgliedern seiner Rezeptorfamilie unterscheidet und darüber direkt den Signalmechanismus des intrazellulären ER $\alpha$  beeinflussen kann. So kann die von Zhu et al. 2006 beschriebene autokrine Signalschleife zwischen ErbB4-Rezeptor und ER $\alpha$ , die durch ErbB4 selbst angetrieben wird, als möglicher Mechanismus für die gesteigerte Wirkung Tamoxifens nach Downregulation des ErbB4-Rezeptors gesehen werden. In Abwesenheit des Rezeptors findet dieser Loop, der Brustkrebszellen in ihrer Proliferation antreibt und dadurch den Tamoxifen-Effekt abschwächt, nicht mehr statt. Gleichzeitig liegt der ER $\alpha$  nun unbesetzt durch 4ICD vor und bietet dem Anti-Estrogen Tamoxifen eine bessere Angriffsfläche.

Es fällt auf, dass die immer wieder betonte ambivalente Funktionsweise des ErbB4-Rezeptors, entweder antiproliferativ oder proliferationssteigernd, bis heute noch nicht endgültig geklärt ist und diese Tatsache daher auch bei der Interpretation der Ergebnisse der hier beschriebenen Experimente zum Tragen kommt. Denn auch beim Versuch, den Hintergrund der Effekte von Lapatinib einerseits und Tamoxifen andererseits unter ErbB4-Knockdown zu klären, kann man mit gegensätzlichen Wirkkomponenten des Rezeptors argumentieren. Die Tatsache, den ErbB4-Rezeptor nur schwer als positiven oder negativen prognostischen Marker für Mamakarzinome einordnen und seine prädiktive Wertigkeit bestimmen zu können, kommt auch in den klinischen Daten zum Ausdruck. Für besseres Outcome unter ErbB4-Überexpression findet man ebenso viele Belege in der Literatur wie für eine Prognoseverschlechterung. Außerdem weiß man, dass ein Ausschalten eines Rezeptors (entweder der Expression oder der Funktion) häufig durch eine Hochregulierung verwandter Rezeptoren wenigstens zu einem Teil kompensiert wird. Auch wenn diese Gegenregulation den Effekt des hier beschriebenen alleinigen ErbB4-Knockdowns relativieren kann, konnten in dieser Arbeit für Zellbehandlung mit Lapatinib und Tamoxifen deutlich gesteigerte Ansprechraten der Brustkrebszellen gezeigt werden. Da sog. off-target Effekte (Einfluß auf die Expression verwandter ErbB-Rezeptoren) ausgeschlossen werden konnten, scheinen diese Ergebnisse tatsächlich auf den ErbB4-Rezeptorstatus zurückzuführen zu sein und stellen einen weiteren Beleg für die Bedeutung dieses noch wenig bekannten ErbB-Rezeptors dar.

## 6. AUSBLICK

Es ist inzwischen schon über 25 bzw. 15 Jahre her, dass mit Tamoxifen und Trastuzumab die Therapie des rezeptorpositiven Mammakarzinoms revolutioniert wurde. Man erhoffte sich enormen Erfolg und gleichzeitig eine tumorspezifischere und somit nebenwirkungsärmere Therapie durch diese modernen, target-spezifischen Wirkstoffe. Auch wenn am Anfang in relativ kurzer Zeit erhoffte Therapieerfolge verbucht werden konnten, musste man im Laufe der Zeit feststellen, dass auch diese neuen Therapieformen Grenzen unterliegen. Es zeigte sich nämlich immer mehr, dass ein Großteil der Patienten trotz immunhistochemisch gesicherter Rezeptorexpression nicht, oder nur ungenügend auf die jeweiligen Antikörper oder Antagonisten ansprachen. Wie man inzwischen weiß, sind die Ursachen hierfür vielfältig. Neben sterischen Gründen und veränderten intrazellulären Signalkaskaden scheint besonders auch die gleichzeitige Expression verschiedener Rezeptoren eine große Rolle zu spielen. Denn genauso wie sich der Estrogenrezeptor und die ErbB-Rezeptoren gegenseitig in ihrer Aktivität beeinflussen, so stehen auch die einzelnen ErbB-Verteiler untereinander in engem Kontakt. Und zwei Verteiler, die dabei lange Zeit ein wenig vernachlässigt wurden, aber wohl doch von Bedeutung sind, sind der ErbB3- und der ErbB4-Rezeptor (56). Im Speziellen unterstreichen auch die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche, dass der ErbB4-Rezeptor auf jeden Fall Einfluss sowohl auf ErbB2- als auch auf ER-gerichtete Therapien hat. Wichtig wird sein, die Rolle dieses Rezeptors als prognostischen und vor allem prädiktiven Marker endgültig zu klären, da die aktuelle Studienlage die Entscheidung absolut noch nicht zulässt, ob es für eine Patientin günstig oder ungünstig ist, wenn ihr Tumor den ErbB4- gleichzeitig zum ErbB2-Rezeptor exprimiert. Darüber in Zukunft eine Aussage treffen zu können, wäre auch die Voraussetzung dafür, die Bestimmung des Rezeptorstatus in die Diagnostik mit auf zu nehmen. Diesbezüglich bleiben die Ergebnisse weiterer Untersuchungen abzuwarten.

In einem ersten Anschlussexperiment unserer Arbeitsgruppe soll die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese belegt werden, dass ErbB4-negative Zellen besser auf Tamoxifen ansprechen, als ErbB4-positive und somit ErbB4 ein Marker für die Sensitivität auf Tamoxifen und ggf. selbst ein therapeutisches Target sein kann.

Ziel dieser Versuche ist es zu zeigen, dass der ER $\alpha$  unter Tamoxifen-Therapie in Zellen nach ErbB4-Knockdown eine geringere Aktivität aufweist, als in Zellen, die den ErbB4-Rezeptor exprimieren. Als experimentelle Grundlage dienen hierbei Luciferase-Assays, die es erlauben, die Promotoraktivität von Genen zu bestimmen. Der Promotor des zu untersuchenden Gens wird hierbei vor das Gen einer Luciferase geschaltet. Dabei handelt es sich um ein Enzym, das unter Anwesenheit von ATP und O<sub>2</sub> die Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin katalysiert. Dabei entsteht Energie, die in Form von Licht im Spektralbereich von 560 nm freigesetzt wird und im Luminometer vermessen werden kann. Je stärker die gemessene Lichtintensität ist, umso stärker ist die Aktivität des vorgeschalteten Promotors. In unserem Fall enthält der Promotor mehrere ERE-Sequenzen, an die der Estrogenrezeptor als Transkriptionsfaktor spezifisch bindet (Vgl. 1.3.3.1.). Somit kann die Aktivität der durch den ER $\alpha$  induzierten Signalwege untersucht werden. Es werden Plasmide mit den entsprechenden Konstrukten in Brustkrebszellen mit und ohne ErbB4-Knockdown eingebracht und diese anschließend mit Tamoxifen behandelt. In der Folge kann die Aktivität der Luciferase bestimmt werden, die somit die Aktivität der ER $\alpha$ -abhängigen Signalwege widerspiegelt. Eine Abnahme der Aktivität nach ErbB4-Knockdown würde bedeuten, dass ein ErbB4-Targeting, sei es ErbB4-Inhibition oder –Knockdown, das Ansprechen auf



Tamoxifen verbessern könnte. Die Abbildung 30 fasst das Prinzip des Nachfolgeexperiments kurz zusammen.

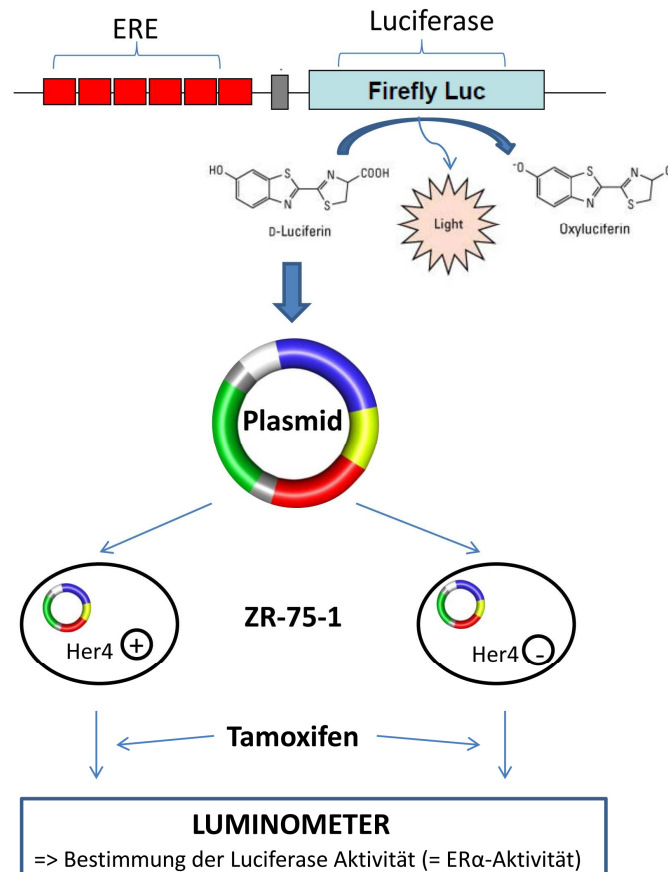


Abb. 30: Graphische Zusammenfassung des Anschluss-experiments. Es handelt sich hierbei um einen sog. dualen Luciferase-Assay, der es erlaubt, die Promotoraktivität von Genen zu untersuchen. In diesem Fall sind multiple ERE-Sequenzen, an die der ERα spezifisch bindet, der DNA-Sequenz einer Luciferase vorgeschaltet. Dieses Konstrukt wird in Plasmide eingebaut, die wiederum in ZR-75-1 transfiziert werden, wobei ErbB4-positive mit ErbB4-Knockdown-Zellen verglichen werden. Nach Zugabe von Tamoxifen kann die Aktivität der Luciferase in den Zellen luminometrisch bestimmt werden.

Die Koexpression des ErbB4-Rezeptors ist aber nur ein Aspekt von vielen, der sich auf die Effektivität target-spezifischer Therapien auswirkt. Um der auch in dieser Arbeit beobachteten und stetig zunehmenden Resistenzentwicklung entgegenzuwirken, ist die Suche nach neuen Therapiestrategien schon seit vielen Jahren in vollem Gange und beinhaltet verschiedene Ansätze. Einerseits wird intensiv an der Entwicklung neuer Therapeutika geforscht. In Anlehnung an Lapatinib kommen zum Beispiel immer neue TKI auf den Markt, die gleichzeitig gegen die Kinsedomänen mehrerer ErbB-Rezeptoren wirken (Neratinib, Canertinib, Afatinib u. a. m., vgl. 8). Bei endokrin resistenten Brusttumoren, die häufig eine erhöhte ErbB3- und ErbB4-Rezeptorexpression aufweisen (115), könnten solche Wirkstoffe, die dann auch diese Rezeptoren blockieren, eine Alternative darstellen. Gleichzeitig werden auch ganz neue Wirkstoffklassen für die Therapie des Mammakarzinoms ausgetestet, die bisher noch gar nicht, oder bislang nur bei anderen, malignen Erkrankungen zum Einsatz kamen. So konnte man beispielsweise mit der Applikation des mTOR-Inhibitors Everolimus, der ursprünglich zur prophylaktischen Immunsuppression nach Nieren- bzw. Herztransplantation entwickelt wurde, bereits in verschiedenen klinischen Phase I und II –Studien in Trastuzumab-resistenten Patientinnen

vielversprechende Ansprechraten erreichen (81). Andere, neue Arzneistoffe, die intrazelluläre Signalwege, beispielsweise über PI3K/Akt oder MAPK, blockieren sollen, befinden sich noch am Anfang ihrer klinischen Erprobung (39).

Auf der anderen Seite werden auch immer öfter Kombinationen mehrerer Wirkstoffe gegen ErbB-Rezeptoren eingesetzt, da sich diese oft synergistisch in ihrer Wirkung verstärken. Dabei erwiesen sich sowohl Kombinationen der beiden monoklonalen Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab als auch Kombinationen aus Trastuzumab und dem TKI Lapatinib in verschiedenen Phase III-Studien überlegen gegenüber einer Trastuzumab-Monotherapie (81).

Ein letzter Ansatz, der auch Grundlage aktueller Untersuchungen ist, ist die gleichzeitige Blockade der ErbB- und des Estrogenrezeptors. Auch diese Arbeit konnte die sehr enge Verbindung zwischen den Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie ErbB und den Estrogenrezeptoren unterstreichen. Greift man eine der beiden Rezeptorklassen medikamentös an, so wird häufig ein Großteil dieser Wirkung durch Hochregulierung der anderen Rezeptorgattung aufgehoben. Gerade bei Patientinnen, die eine Resistenz gegenüber endokrinen Therapien aufweisen, werden daher zunehmend Wirkstoffe gegen ErbB2 und ER miteinander kombiniert und das mit vielversprechenden Resultaten. *In vitro* konnte durch die zusätzliche Applikation von Lapatinib als dualem ErbB1/ ErbB2- Inhibitor in ER-positiven, ursprünglich Tamoxifen-resistenten Tumorzellen bereits die Sensitivität gegenüber Tamoxifen wiederhergestellt und ein kompletter Zellzyklus-arrest erreicht werden (21, 68). Aufgrund solcher Ergebnisse dauerte es nicht lange, bis auch *in vivo* und klinisch am Patienten ähnliche Wirkstoffkombinationen getestet wurden. So konnte im Rahmen der TAnDEM-Studie die Kombination aus Anastrozol und Trastuzumab einen Vorteil gegenüber der alleinigen Anastrozol-Therapie zeigen. Ebenso positiv wirkte sich in einer großen Studie mit 1286 Patienten die Hinzunahme von Lapatinib zu Letrozol auf das Überleben und die Ansprechrate aus (91).

Untersuchungen zu target-spezifischen Tumorthérapien werden intensiv weiter voran getrieben, um erstens die Gründe für Resistenzentwicklungen endgültig aufzudecken und zweitens darauf entsprechend zu reagieren. Man darf gespannt sein, welche Rolle der ErbB4-Rezeptor zukünftig für die Therapieentscheidung des Mammakarzinoms spielen wird.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, et al. Expression and co-expression of the members of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family in invasive breast carcinoma. *Br. J. Cancer* 2004;91:1532–42.
- (2) Albanell J, Codony J, Rovira A, Mellado B, Gascón P. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4. *Adv. Exp. Med. Biol* 2003;532:253–68.
- (3) Alberts B. *Molekularbiologie der Zelle*. 5th ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2011. LXII, 1801 S. ISBN: 3-527-30492-4.
- (4) Ali S, Metzger D, Bornert JM, Chambon P. Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region. *EMBO J* 1993;12:1153–60.
- (5) Aqeilan RI, Donati V, Gaudio E, et al. Association of Wwox with ErbB4 in breast cancer. *Cancer Res* 2007;67:9330–6.
- (6) Bartsch R, Berghoff A, Pluschnig U, et al. Impact of anti-HER2 therapy on overall survival in HER2-overexpressing breast cancer patients with brain metastases. *Br. J. Cancer* 2012;106:25–31.
- (7) Baselga J, Cortés J, Kim S, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med* 2012;366:109–19.
- (8) Baselga J, Swain S. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 463-475.
- (9) Beatson GT. On the treatment of inoperable cases of carcinogen of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet* 1896; 2:104–107.
- (10) Beinder E. *Gynäkologie und Geburtshilfe, Mit 237 Tabellen*. 2nd ed. Kiechle M, ed. München: Elsevier, Urban & Fischer, 2011. XII, 577 S.
- (11) Berstad MB, Weyergang A, Berg K. Photochemical internalization (PCI) of HER2-targeted toxins: synergy is dependent on the treatment sequence. *Biochim. Biophys. Acta* 2012;1820:1849–58.
- (12) Bertos NR, Park M. Breast cancer - one term, many entities? *J. Clin. Invest* 2011;121:3789–96.
- (13) Bièche I, Onody P, Tozlu S, Driouch K, Vidaud M, Lidereau R. Prognostic value of ERBB family mRNA expression in breast carcinomas. *Int. J. Cancer* 2003;106:758–65.
- (14) Böcker W. *Pathologie, Mit rund 1600 meist farbigen Abbildungen und über 200 Tabellen*. 4th ed. Heitz U, ed. München, Jena: Elsevier, Urban & Fischer, op. 2008. XXX, 1362 str.
- (15) Bublil EM, Yarden Y. The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19(2): 124-34.
- (16) Bryant JA, ed. *The eukaryotic cell cycle*. 1st ed. New York: Taylor & Francis, 2008. 301 p. (SEB experimental biology series; vol. 59).
- (17) Burris HA. Dual kinase inhibition in the treatment of breast cancer: initial experience with the EGFR/ErbB-2 inhibitor lapatinib. *Oncologist* 2004;9 Suppl 3:10–5.

- (18) Cameron D, Casey M, Oliva C, Newstat B, Imwalle B, Geyer CE. Lapatinib plus capecitabine in women with HER-2-positive advanced breast cancer: final survival analysis of a phase III randomized trial. *Oncologist* 2010;15:924–34.
- (19) Chen X, Yeung TK, Wang Z. Enhanced drug resistance in cells coexpressing ErbB2 with EGF receptor or ErbB3. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2000;277:757–63.
- (20) Chernajovsky Y, Nissim A. Therapeutic antibodies. Berlin: Springer, 2008. 1 online resource (xi, 380. (Handbook of experimental pharmacology; vol. 181).
- (21) Chu I, Blackwell K, et al. The Dual ErbB1/ErbB2 inhibitor, Lapatinib (GW572016), cooperates with Tamoxifen to inhibit both cell proliferation and Estrogen-dependent gene expression in antiestrogen-resistant breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65:18-25.
- (22) Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp. Cell Res* 2003;284:54–65.
- (23) Clarke R, Liu MC, Bouker KB, et al. Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene* 2003;22:7316–39.
- (24) Couillard S, Gutman M, Labrie C, Bélanger A, Candas B, Labrie F. Comparison of the effects of the antiestrogens EM-800 and tamoxifen on the growth of human breast ZR-75-1 cancer xenografts in nude mice. *Cancer Res* 1998;58:60–4.
- (25) Creighton CJ, Hilger AM, Murthy S, Rae JM, Chinnaiyan AM, El-Ashry D. Activation of mitogen-activated protein kinase in estrogen receptor alpha-positive breast cancer cells in vitro induces an in vivo molecular phenotype of estrogen receptor alpha-negative human breast tumors. *Cancer Res* 2006;66:3903–11.
- (26) Creighton CJ, Massarweh S, Huang S, et al. Development of resistance to targeted therapies transforms the clinically associated molecular profile subtype of breast tumor xenografts. *Cancer Res* 2008;68:7493–501.
- (27) Das PM, Thor AD, et al. Reactivation of epigenetically silenced HER4/ERBB4 results in apoptosis of breast cancer cells. *Oncogene* 2010; 29:5214-9.
- (28) Davies, C., et al., Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*, 2011; 378(9793): p. 771-84.
- (29) Diermeier S, Horváth G, Knuechel-Clarke R, Hofstaedter F, Szöllosi J, Brockhoff G. Epidermal growth factor receptor coexpression modulates susceptibility to Herceptin in HER2/neu overexpressing breast cancer cells via specific erbB-receptor interaction and activation. *Exp. Cell Res* 2005;304:604–19.
- (30) Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2007;9:R6.
- (31) Elenius K, Choi CJ, Paul S, Santiestevan E, Nishi E, Klagsbrun M. Characterization of a naturally occurring ErbB4 isoform that does not bind or activate phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene* 1999;18:2607–15.
- (32) Elenius K, Corfas G, Paul S, et al. A novel juxtamembrane domain isoform of HER4/ErbB4. Isoform-specific tissue distribution and differential processing in response to phorbol ester. *J. Biol. Chem* 1997;272:26761–8.
- (33) Enmark E, Peltö-Huikko M, et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin. Endocrinol Metab.* 1997;82:4258-65.

- (34) Filardo EJ, Thomas P. GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers estrogen release. *Trends Endocrinol Metab.* 2005;16:362-7.
- (35) Fowler AM, Alarid ET. Amping up estrogen receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2007;9:305.
- (36) Fox EM, Davis RJ, Shupnik MA. ERbeta in breast cancer--onlooker, passive player, or active protector? *Steroids* 2008;73:1039-51.
- (37) Frasar J, Stossi F, Danes JM, et al. Selective estrogen receptor modulators: discrimination of agonistic versus antagonistic activities by gene expression profiling in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2004; 64:1522-33.
- (38) Garrett TPJ, McKern NM, Lou M, et al. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol. Cell* 2003;11:495-505.
- (39) Ghayad SE, Vendrell JA, Ben Larbi S, Dumontet C, Bieche I, Cohen PA. Endocrine resistance associated with activated ErbB system in breast cancer cells is reversed by inhibiting MAPK or PI3K/Akt signaling pathways. *Int. J. Cancer* 2010;126:545-62.
- (40) Gianni L, Pienkowski T, et al. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomized multicenter, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13:25-32.
- (41) Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 1997;16:1647-55.
- (42) Gutman M, Couillard S, Roy J, Labrie F, Candas B, Labrie C. Comparison of the effects of EM-652 (SCH57068), tamoxifen, toremifene, droloxifene, idoxifene, GW-5638 and raloxifene on the growth of human ZR-75-1 breast tumors in nude mice. *Int. J. Cancer* 2002;99:273-8.
- (43) Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1994;91:8132-6.
- (44) Haas S, Gevensleben H, Rabstein S, Harth V, Pesch B, Brüning T *et al.* Expression of heregulin, phosphorylated HER-2, HER-3 and HER-4 in HER-2 negative breast cancers. *Oncol Rep* 2009; 21: 299-304.
- (45) Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J. Clin. Oncol* 1999;17:1474-81.
- (46) Heldin CH, Ericsson J. Signal transduction. RIPPING tyrosine kinase receptors apart. *Science* 2001;294:2111-3.
- (47) Holbro T, Beerli RR, Maurer F, Koziczak M, Barbas CF, Hynes NE. The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2003;100:8933-8.
- (48) Hollmén M. Role of ErbB2 and ErbB4 in Cancer Growth, Prognosis and as Targets for Immunotherapy 2010.
- (49) Howard A, Pelc S. Synthesis of Desoxyribonucleic Acid in Normal and Irradiated Cells and Its Relation to Chromosome Breakage. *Int J Radiat Biol* 1986;49:207-18.

- (50) Hudziak RM, Lewis GD, et al. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol.* 1989; 9(3):1165-72.
- (51) Hutcheson IR, Goddard L, Barrow D, et al. Fulvestrant-induced expression of ErbB3 and ErbB4 receptors sensitizes oestrogen receptor-positive breast cancer cells to heregulin  $\beta$ 1. *Breast Cancer Res* 2011;13:R29.
- (52) Jordan, V.C., Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. *Nat Rev Drug Discov*, 2003; 2(3): 205-13.
- (53) Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TPJ, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp. Cell Res* 2003;284:31–53.
- (54) Junttila TT, Laato M, Vahlberg T, et al. Identification of patients with transitional cell carcinoma of the bladder overexpressing ErbB2, ErbB3, or specific ErbB4 isoforms: real-time reverse transcription-PCR analysis in estimation of ErbB receptor status from cancer patients. *Clin. Cancer Res* 2003;9:5346–57.
- (55) Junttila TT, Sundvall M, Lundin M, et al. Cleavable ErbB4 isoform in estrogen receptor-regulated growth of breast cancer cells. *Cancer Res* 2005;65:1384–93.
- (56) Karamouzis M, Badra F, Papavassiliou A. Breast cancer: The upgraded role of HER-3 and HER-4. *JBCB* 2007;39: 851-6.
- (57) Katsumata M, Drebin JA, Greene MI. Trastuzumab in breast cancer. *N. Engl. J. Med* 2006;354:640-4; author reply 640-4.
- (58) Kew TY, Bell JA, Pinder SE, et al. c-erbB-4 protein expression in human breast cancer. *Br. J. Cancer* 2000;82:1163–70.
- (59) Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* 2001;29:2905–19.
- (60) Knowlden JM, Hutcheson IR, Jones HE, et al. Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. *Endocrinology* 2003;144:1032–44.
- (61) Komuro A, Nagai M, Navin NE, Sudol M. WW domain-containing protein YAP associates with ErbB-4 and acts as a co-transcriptional activator for the carboxyl-terminal fragment of ErbB-4 that translocates to the nucleus. *J. Biol. Chem* 2003;278:33334–41.
- (62) Konecny GE, Pegram MD, Venkatesan N, et al. Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Res* 2006;66:1630–9.
- (63) Koutras AK, Kalogeras KT, Dimopoulos M, et al. Evaluation of the prognostic and predictive value of HER family mRNA expression in high-risk early breast cancer: a Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) study. *Br. J. Cancer* 2008;99:1775–85.
- (64) Kubbies M, Hoehn H, et al. Cell cycle analysis via BrdU-Hoechst flow cytometry: principles and applications. In: *Flow Cytometry: Advanced Research and Clinical Application*. Volume II, Yen A. (ed.), CRS Press, Florida 1989, p. 5 -28.
- (65) Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, et al. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol* 2000;74:311–7.
- (66) Lajtha LG. On the concept of the cell cycle. *J. Cell. Physiol* 1963;62:SUPPL1:143-5.
- (67) Lane HA, Beuvink I, Motoyama AB, Daly JM, Neve RM, Hynes NE. ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27(Kip1)-Cdk2 complex formation:

- receptor overexpression does not determine growth dependency. *Mol. Cell. Biol* 2000;20:3210–23.
- (68) Leary AF, Drury S, Detre S, et al. Lapatinib restores hormone sensitivity with differential effects on estrogen receptor signaling in cell models of human epidermal growth factor receptor 2-negative breast cancer with acquired endocrine resistance. *Clin. Cancer Res* 2010;16:1486–97.
- (69) Lee H, Bai W. Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* 2002; 22:5835–45.
- (70) Lee H, Jung K, Huang YZ, et al. Presenilin-dependent gamma-secretase-like intramembrane cleavage of ErbB4. *J. Biol. Chem* 2002;277:6318–23.
- (71) Lee-Hoeflich ST, Crocker L, Yao E, et al. A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy. *Cancer Res* 2008;68:5878–87.
- (72) Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010;141:1117–34.
- (73) Levin ER, Pietras RJ. Estrogen receptors outside the nucleus in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2008; 108:351–61.
- (74) Linggi B, Cheng QC, Rao AR, Carpenter G. The ErbB-4 s80 intracellular domain is a constitutively active tyrosine kinase. *Oncogene* 2006;25:160–3.
- (75) Linggi B, Carpenter G. ErbB-4 s80 intracellular domain abrogates ETO2-dependent transcriptional repression. *J. Biol. Chem* 2006;281:25373–80.
- (76) Loontjens FG, McLaughlin LW, Diekmann S, Clegg RM. Binding of Hoechst 33258 and 4',6'-diamidino-2-phenylindole to self-complementary decadeoxynucleotides with modified exocyclic base substituents. *Biochemistry* 1991;30:182–9.
- (77) Määttä JA, Sundvall M, Junttila TT, et al. Proteolytic cleavage and phosphorylation of a tumor-associated ErbB4 isoform promote ligand-independent survival and cancer cell growth. *Mol. Biol. Cell* 2006;17:67–79.
- (78) Machleidt A, Buchholz S, et al. The prognostic value of Her4 receptor isoform expression in triple-negative and Her2 positive breast cancer patients. *BMC Cancer* 2013, 13:437.
- (79) Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys* 2004;58:903–13.
- (80) Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J. Clin. Oncol* 2003;21:2787–99.
- (81) Mohd Shariar M, Crown J, Hennesy BT. Overcoming resistance and restoring sensitivity to HER2-targeted therapies in breast cancer. *Annals of oncology* 2012;00: 1-10.
- (82) Mokbel K, Hassanally D. From HER2 to herceptin. *Curr Med Res Opin* 2001;17:51–9.
- (83) Becton, Dickinson and Company. BD FACSCanto II Flow cytometer reference manual. 2006.
- (84) Nagy P, Vereb G, Sebestyén Z, et al. Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2. *J. Cell. Sci* 2002;115:4251–62.
- (85) Naresh A, Long W, Vidal GA, et al. The ERBB4/HER4 intracellular domain 4ICD is a BH3-only protein promoting apoptosis of breast cancer cells. *Cancer Res* 2006;66:6412–20.

- (86) Ni CY, Murphy MP, Golde TE, Carpenter G. gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science* 2001;294:2179–81.
- (87) Oh AS, Lorant LA, Holloway JN, Miller DL, Kern FG, El-Ashry D. Hyperactivation of MAPK induces loss of ERalpha expression in breast cancer cells. *Mol. Endocrinol* 2001;15:1344–59.
- (88) Olayioye MA. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res* 2001;3:385–9.
- (89) Ormerod MG, Kubbies M. Cell cycle analysis of asynchronous cell populations by flow cytometry using bromodeoxyuridine label and Hoechst-propidium iodide stain. *Cytometry* 1992;13:678–85.
- (90) Osborne CK, Bardou V, Hopp TA, et al. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst* 2003;95:353–61.
- (91) Osborne, C.K. and R. Schiff, Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med*, 2011; 62: p. 233-47.
- (92) Pardee AB. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1974;71:1286–90.
- (93) Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene* 1996;13:63–72.
- (94) Prickett TD, Agrawal NS, Wei X, et al. Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. *Nat. Genet* 2009;41:1127–32.
- (95) Qiu C, Tarrant MK, et al. Mechanism of activation and inhibition of the HER4/ErbB4 kinase. *Structure* 2008; 16(3): 460-7.
- (96) Riggs, B.L. and L.C. Hartmann, Selective estrogen-receptor modulators : mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med*, 2003; 348(7): p. 618-29.
- (97) Ring A, Dowsett M. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocr. Relat. Cancer* 2004;11:643–58.
- (98) Robertson, J.F., Fulvestrant (Faslodex) -- how to make a good drug better. *Oncologist*, 2007; 12(7): p. 774-84.
- (99) Robinson AG, Turbin D, Thomson T, et al. Molecular predictive factors in patients receiving trastuzumab-based chemotherapy for metastatic disease. *Clin. Breast Cancer* 2006;7:254–61.
- (100) Roskoski R. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2004;319:1–11.
- (101) Ross, Fletcher. The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Oncologist* 1998;3:237–52.
- (102) Santen, R.J., Clinical review: Effect of endocrine therapies on bone in breast cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011; 96(2): p. 308-19.
- (103) Santen RJ, Fan P, Zhang Z, et al. Estrogen signals via an extranuclear pathway involving IGF-1R and EGFR in tamoxifen-sensitive and -resistant breast cancer cells. *Steroids* 2009; 74:586–94.



- (104) Schiff R, Massarweh SA, Shou J, Bharwani L, Mohsin SK, Osborne CK. Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. *Clin. Cancer Res* 2004;10:331S-6S.
- (105) Shaaban AM, O'Neill PA, Davies MPA, et al. Declining estrogen receptor-beta expression defines malignant progression of human breast neoplasia. *Am. J. Surg. Pathol* 2003;27:1502-12.
- (106) Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-82.
- (107) Soltoff SP, Cantley LC. p120cbl is a cytosolic adapter protein that associates with phosphoinositide 3-kinase in response to epidermal growth factor in PC12 and other cells. *J. Biol. Chem* 1996;271:563-7.
- (108) Speirs V, Skliris GP, et al. Distinct expression patterns of ER alpha and ER beta in normal human mammary gland. *J. Clin. Pathol.* 2002;55:371-4.
- (109) Standards LG. LGC: Advanced Catalogue Search. (Accessed November 11, 2011, at <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CRL-1500&Template=cellBiology>).
- (110) Starr A, Greif J, Vexler A, et al. ErbB4 increases the proliferation potential of human lung cancer cells and its blockage can be used as a target for anti-cancer therapy. *Int. J. Cancer* 2006;119:269-74.
- (111) Stern DF. ErbBs in mammary development. *Exp. Cell Res* 2003;284:89-98.
- (112) Stern DF. ERBB3/HER3 and ERBB2/HER2 duet in mammary development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2008;13:215-23.
- (113) Subramanian A, Mokbel K. The role of Herceptin in early breast cancer. *Int Semin Surg Oncol* 2008;5:9.
- (114) Sui W, Ou M, Chen J, et al. Comparison of immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) assessment for Her-2 status in breast cancer. *World J Surg Onc* 2009;7:83.
- (115) Sutherland R. Endocrine resistance in breast cancer: new roles for ErbB3 and ErbB4. *Sutherland Breast Cancer Research* 2011, 13:106.
- (116) Tang CK, Concepcion XZ, Milan M, Gong X, Montgomery E, Lippman ME. Ribozyme-mediated down-regulation of ErbB-4 in estrogen receptor-positive breast cancer cells inhibits proliferation both in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1999;59:5315-22.
- (117) Tang CK, Goldstein DJ, Payne J, et al. ErbB-4 ribozymes abolish neuregulin-induced mitogenesis. *Cancer Res* 1998;58:3415-22.
- (118) Valabrega G, Montemurro F, Sarotto I, et al. TGFalpha expression impairs Trastuzumab-induced HER2 downregulation. *Oncogene* 2005;24:3002-10.
- (119) Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 1995;184:39-51.

- (120) Vexler A, Lidawi G, Loew V, et al. Anti-ERBB4 targeted therapy combined with radiation therapy in prostate cancer. Results of in vitro and in vivo studies. *Cancer Biol. Ther* 2008;7:1090–4.
- (121) Viani GA, Afonso SL, Stefano EJ, Fendi LI de, Soares FV. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer* 2007;7:153.
- (122) Vogel, V.G., et al., Update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 Trial: Preventing breast cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2010; 3(6): p. 696-706.
- (123) Vu T, Claret FX, Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Front Oncol.*, 2012; 2: 62.
- (124) Wilken JA, Maihle NJ. Primary trastuzumab resistance: new tricks for an old drug. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 2010;1210:53–65.
- (125) Williams CC, Allison JG, Vidal GA, et al. The ERBB4/HER4 receptor tyrosine kinase regulates gene expression by functioning as a STAT5A nuclear chaperone. *J. Cell Biol* 2004;167:469–78.
- (126) Witton CJ, Reeves JR, Going JJ, Cooke TG, Bartlett JMS. Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J. Pathol* 2003;200:290–7.
- (127) Wood ER, Truesdale AT, et al. A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (Lapatinib): relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells. *Cancer Res.* 2004; 64(18): 6652-9.
- (128) Xia W, Bacus S, Hegde P, et al. A model of acquired autoresistance to a potent ErbB2 tyrosine kinase inhibitor and a therapeutic strategy to prevent its onset in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2006;103:7795–800.
- (129) Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N. Engl. J. Med* 2006;354:270–82.
- (130) Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2001;2:127–37.
- (131) Zeng N, Liu L, McCabe M, Jones D, Ichimura K, Collins V. Real-time quantitative PCR analysis with FRET probes reveals differential expression of the four ERBB4 juxtamembraneregion variants between medulloblastoma and pilocytic astrocytoma. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2008.
- (132) Zhu Y, Sullivan LL, Nair SS, et al. Coregulation of estrogen receptor by ERBB4/HER4 establishes a growth-promoting autocrine signal in breast tumor cells. *Cancer Res* 2006;66:7991–8.

## Internetquellen:

- (133) <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/woldeyesus-masresha-tsegaye-2001-02-14/HTML/chapter1.html>.
- (134) [http://www.scbt.com/gene\\_silencers.html](http://www.scbt.com/gene_silencers.html).
- (135) [http://www.biomol.de/wiki/index.php?title=Annexin\\_V\\_Apoptosis\\_Detection\\_Kit](http://www.biomol.de/wiki/index.php?title=Annexin_V_Apoptosis_Detection_Kit).

## **8. ERKLÄRUNG ZUR EIGENSTÄNDIGEN ANFERTIGUNG**

Die vorliegende Dissertation wurde von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gero Brockhoff angeregt und deren Ausarbeitung durch ihn selbst, sowie durch Frau PD Dr. rer. nat. Simone Diermeier-Daucher aus dem Lehrstuhl für Gynäkologie und Geburtshilfe des Caritaskrankenhauses St. Josef Regensburg (Direktor: Prof. Dr. med. Olaf Ortmann) überwacht.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Bezugsorte gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater und andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation steht. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder in ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

## 9. DANKSAGUNG

Ganz besonders will ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gero Brockhoff bedanken, der mir dieses interessante Thema gestellt und mich sowohl während der experimentellen Phase als auch während der schriftlichen Ausarbeitung jederzeit hervorragend unterstützt hat. Die hilfreichen Ratschläge und Tipps haben mir das wissenschaftliche Arbeiten enorm erleichtert und werden mir sicherlich auch in Zukunft von großem Nutzen sein.

Des Weiteren gilt mein großer Dank Frau PD Dr. rer. nat. Simone Diermeier-Daucher für die intensive und stets aufmunternde Betreuung bei der Planung sowie der praktischen Ausführung meiner Experimente. Besonders bei der Handhabung des Durchflusszytometers sowie der Gestaltung von Graphiken oder Präsentationen stand sie mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

Darüber hinaus will ich auch Frau Dr. med. vet. Anja-Kathrin Wege für die Durchsicht meiner statistischen Auswertung danken.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau Marietta Bock bedanken, die mir unermüdlich qualifizierte Hilfestellung in der Zellkultur und insbesondere bei der Anfertigung der Western-Blots leistete.

Außerdem danke ich Herrn Gerhard Piendl und Frau Rosi Kromas, die mich in die Techniken der Zellkultur eingelernt und mir bei Fragen oder Problemen jeglicher Art immer wieder gerne geholfen haben.

Der gesamten Arbeitsgruppe Brockhoff will ich danken für die hervorragende und kollegiale Stimmung, die mir den Gang ins Labor stets erleichtert hat.

Zu guter Letzt will ich meinen Eltern Monika und Fritz Chittka danken, deren unerschöpfliche Unterstützung mir erst das Medizinstudium ermöglichte. Auch danke ich meiner Freundin Christiane für ihre Geduld und Unterstützung in den Phasen langer und anstrengender Laborarbeit.